

哺乳類細胞の低容量ストレス応答における ヒストンシャペロン HIRA の機能解析

長垣 良和

目次

要旨	3
略語	5
第一章 序論	7
1-1 はじめに	8
1-2 適応的ストレス応答	8
1-2-1 ストレス応答性遺伝子の発現制御	8
1-2-2 低容量ストレス	10
1-2-3 ホルミースス	10
1-2-4 獲得耐性／交差耐性	12
1-2-5 分裂酵母における交差耐性欠損株の原因遺伝子	12
1-3 ヒストンシャペロン HIRA	13
1-3-1 HIRA の構造と機能	13
1-3-2 ヒストン H3.3 と遺伝子発現調節	14
1-4 本研究の目的	15
第二章 材料と方法	16
2-1 試薬、化合物	17
2-2 細胞	17
2-3 熱ストレスアッセイ	17
2-4 レンチウイルス感染による遺伝子導入	17
2-5 siRNA	18
2-6 マイクロアレイによる遺伝子発現解析	19
2-7 定量 RT-PCR	19
2-8 クロマチン免疫沈降 (chromatin immunoprecipitation: ChIP)	20
2-9 クロマチン免疫沈降シーケンシング (ChIP sequencing: ChIP-seq)	22
2-10 ChIP-seq のデータ解析	22
2-10-1 MA プロット	22
2-10-2 パスウェイ解析	23
2-10-3 モチーフ解析	23
2-11 免疫沈降 (immunoprecipitation: IP)	23
2-12 ウェスタンブロッティング	24
2-13 統計解析	24
第三章 結果	25
3-1 ヒト細胞における獲得耐性実験系の構築	26

3-1-1	熱ストレスによる獲得耐性の検証	26
3-1-2	異なるストレス種による交差耐性の検討	28
3-2	ヒストンシャペロン HIRA と獲得耐性の関連性の検証	29
3-3	低容量ストレス応答による遺伝子発現変動の解析	33
3-3-1	熱ストレス時におけるストレス応答性因子の遺伝子発現解析	33
3-3-2	低容量ストレス応答における熱ショックタンパク質の遺伝子発現	37
3-3-3	獲得耐性における熱ショックタンパク質の遺伝子発現	37
3-4	獲得耐性における HIRA の作用機構の解析	40
3-4-1	クロマチン免疫沈降に使用する抗 HIRA 抗体の作製	40
3-4-2	クロマチン免疫沈降シーケンスによる HIRA の局在の網羅的な解析	41
3-4-3	熱ショックタンパク質遺伝子座における HIRA とヒストン H3.3 の局在	46
3-5	獲得耐性の持続性の検証	52
3-5-1	HIRA やヒストン H3.3 の <i>HSPA1A</i> 遺伝子座への局在の持続時間	52
3-5-2	獲得耐性効果の持続時間	53
3-6	獲得耐性時に HIRA と協調的に機能する因子の探索	58
3-6-1	HSP70 及び HSF1 の検討	58
3-6-2	HIF-1 の検討	59
3-6-3	AP-1 の検討	61
第四章	考察	67
4-1	低容量ストレス応答における HIRA の機能	68
4-2	獲得耐性の持続性とエピジェネティックメモリー	68
4-3	HIRA の協調因子としての転写因子	70
参考文献		72
謝辞		78

要旨

細胞は常に周囲の環境から様々な刺激を受けており、それらの刺激はしばしば細胞にとってストレスとなる。こうした環境変化に適応するために、細胞はストレスに対する迅速かつ適切な応答機構を進化的に発達させてきた。本研究では、その中でも比較的低容量のストレスに対する生体応答に着目する。低容量のストレスは、致死的なストレスに対する防御能を細胞に付与することが知られており、この現象は獲得耐性と呼ばれる。このようなストレスに対する適応的な生体応答は、酵母から植物、動物に至るまで多くの真核生物で広く保存されて観察される。しかしながら、特に哺乳類細胞において、その分子機構は未だ十分には解明されていない。

著者が所属していた研究室の先行研究において、分裂酵母での獲得耐性にはヒストンシャペロン HIRA が必要であることが示されていた。本研究では、ヒト細胞において同様に HIRA が獲得耐性に必要であるかを明らかにし、低容量ストレスによる適応応答の分子機構を解明することを目的とした。そのために、まず、ヒト培養細胞において、熱ストレスを利用した獲得耐性実験系を構築した。ヒト培養細胞に 40°C で 2 時間の低容量ストレス（プライミングストレス）を与えた後、47°C で 35 分間の致死ストレスを与えたところ、プライミングストレスにより細胞の致死ストレス耐性が有意に増加することを明らかにした。一方、HIRA ノックダウン細胞ではこの獲得耐性表現型の消失がみられ、HIRA が低容量ストレス応答に必要であることが示唆された。次に、低容量ストレス応答の分子機構を解明するため、RNA シーケンス解析によりプライミングストレス処理で発現が増加する遺伝子群を網羅的に解析した結果、特に HSP70 や HSP40 などの熱ショックタンパク質が顕著に増加することを見出した。さらに、プライミングストレスに続けて致死ストレスを与える獲得耐性条件では、致死ストレス単独の場合と比べて、HSP70 や HSP40 の発現がより強く誘導され、これらが適応的ストレス応答に関与する可能性が示された。HIRA ノックダウン細胞では、プライミングストレス後の HSP70 や HSP40 の発現増加には影響がみられなかったが、獲得耐性条件での発現が顕著に減少した。このことから、低容量ストレス応答時に HIRA は、致死ストレスに備えて HSP 遺伝子の転写誘導に適した状態を形成し、維持することが示唆された。HIRA はヒストン H3.3 特異的シャペロンとして機能するため、HIRA 及びヒストン H3.3 の結合部位をクロマチン免疫沈降シーケンス解析により網羅的に同定した。プライミングストレス後の細胞では HIRA 及びヒストン H3.3 が特に HSP 遺伝子の転写開始点近傍に集積することが観察された。ヒストン H3.3 の導入とともに、転写活性化に関連するヒストン翻訳後修飾の増加も見られ、これらが HSP 遺伝子の発現誘導に対するエピジェネティックなメモリーとして形成され、将来的なストレスに対する耐性を高めることに関与していることが示唆された。

本研究で得られた知見により、哺乳類細胞が周囲の環境からのストレスに対して適

応し生存するためには、低容量のストレスに暴露された際にヒストンシャペロン HIRA 及びヒストン H3.3 を介してストレス応答性遺伝子の発現を制御することが重要であることが明らかとなった。

略語

AP-1	activator protein-1
bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
CABIN1	calcineurin binding protein 1
cDNA	complementary DNA
ChIP	chromatin immunoprecipitation
ChIP-seq	ChIP sequencing
CPM	counts per million mapped reads
dCTP	deoxycytidine triphosphate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DNAJB1	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B1
Dox	doxycycline
dT	deoxythymidine
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
FDR	false discovery rate
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GO	gene ontology
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
hg19	human genome assembly version19
HIF-1	hypoxia inducible factor-1
HIRA	HIR histone cell cycle regulation defective homolog A
HRP	horseradish peroxidase
HSF	heat shock transcription factor
HSP	heat shock protein
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
IgG	immunoglobulin G
IP	immunoprecipitation
MED1	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1
NMI	normal mouse IgG
NP-40	nonyl phenoxypolyethoxylethanol
Nrf2	nuclear factor erythroid-derived 2 related factor 2
NRI	normal rabbit IgG

ORF	open reading frame
PBS	phosphate-buffered saline
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
ROS	reactive oxygen species
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
TNT	Tris-NaCl-Tween 20
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
TSS	transcription start site
TTS	transcription termination site
UBN1	ubinuclein 1
UCSC	University of California, Santa Cruz
UPR	unfolded protein response
UTR	untranslated region
UV	ultraviolet
WCL	whole cell lysate

第一章

序論

1-1 はじめに

細胞は常に周囲の環境から多様な刺激を受けており、それらの刺激は多くの場合、細胞にとってストレスとなる。細胞にとっての「ストレス」とは、物理的、化学的、または生物学的に有害な因子を指し、その例として温度、栄養状態、pH、浸透圧、紫外線などの環境変化が挙げられる。これらのストレスは、タンパク質や DNA、その他の生体高分子に変異や損傷を引き起こし、細胞の生存を脅かす要因となる。したがって、細胞が環境変化に迅速かつ効果的に対応する能力は生存に不可欠であり、細胞はストレスに対応するための広範かつ精巧な応答機構を進化の過程で獲得してきた。

ストレス応答に関する研究は応用範囲が広く、特に医療分野においても重要な役割を果たしている。例えば、神経変性疾患 (Ajooolabady et al. 2022; Maze et al. 2015)、心血管疾患 (Liu and Dudley 2014; Minamino et al. 2010) 及びがん (Nie et al. 2021; Tian et al. 2021) に対して、ストレス応答経路を標的とした新しい治療法の開発が進められている。また、ストレス応答を調節することで、老化プロセスを遅延させ、寿命を延長する可能性についても研究が進んでいる (Derisbourg et al. 2021; Kirkwood and Austad 2000)。総じて、細胞のストレス応答は生物の環境への適応と生存において中心的な役割を果たしており、その分子機構の解明は、基礎生物学から応用医学に至るまで幅広い分野で重要な意義をもつ。

1-2 適応的ストレス応答

1-2-1 ストレス応答性遺伝子の発現制御

細胞がストレスを受けると、細胞の恒常性を維持するために一連のストレス応答反応が誘導される。この反応には、ストレスの感知、ストレス応答性タンパク質の発現誘導、損傷の修復、さらなる損傷からの防御、そして致命的な損傷を受けた細胞でのアポトーシスや細胞老化の誘導といったイベントが含まれる。その中でも初期の反応として重要なのが、ストレス因子を感知し、保護機構を迅速に活性化することである。この主要な応答機構として、ストレス応答性遺伝子の発現制御が挙げられる。

一般的に、ストレスのない通常時では、ストレス応答性遺伝子の転写を活性化する転写因子は、ストレスセンサータンパク質によって細胞質内に係留されたり、分解が促進されたりすることで活性が抑制されている。それゆえ、ストレス応答性遺伝子の発現量は低く保たれている。一方、細胞がストレスを受けると、ストレスセンサータンパク質がリン酸化等の化学修飾を受け、転写因子との相互作用が不安定化する。その結果、転写因子はストレスセンサータンパク質から解放されて核内に移行し、標的遺伝子の転写を開始する。この機構の利点は、細胞がストレスを受けてからストレス応答性遺伝子を発現するまでに転写因子の新規合成を行う必要がないため、ストレスに対する迅速な初動が可能であることである。また、細胞の恒常性を保つという観点から、ストレスの強

度や期間に応じた反応が起こり、細胞内の損傷への対応が完了した後は、定常状態に戻る仕組みも備えている。

ストレスセンサータンパク質、転写因子及びストレス応答性遺伝子の組み合わせは、ストレスの種類によって異なる。具体例として、高温環境における熱ショック応答が挙げられる。熱ショック応答では、シャペロンタンパク質である熱ショックタンパク質 (heat shock protein: HSP) の発現が迅速に誘導され、変性したタンパク質に結合することで凝集を防ぎ、さらに再折りたたみや分解を促進する。熱ショックタンパク質の発現制御のマスターレギュレーターである転写因子 HSF1 (heat shock transcription factor 1) は、非ストレス時にはセンサータンパク質として機能する HSP90 によって細胞質に係留され、不活性化状態にある (Ali et al. 1998; Bharadwaj et al. 1999; Zou et al. 1998)。細胞が熱ショック環境下におかれた場合には、熱ストレスによって蓄積した変性タンパク質が HSP90 への結合について HSF1 と競合する。その結果、HSF1 が遊離し、ホモ三量体を形成して核内に移行し、HSP をはじめとした標的遺伝子のプロモーターに存在する熱ショック応答エレメントに結合し、ストレス応答性遺伝子の転写を開始する (Pelham 1982)。また、HSF1 の標的因子の 1 つに HSF1 三量体の不活性化因子である HSBP1 (heat shock binding protein 1) があり、負のフィードバックを形成することで、熱ショック応答の一過性が担保されている (Satyal et al. 1998)。

また、活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) に対する酸化ストレス応答では、転写因子 Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) が中心的な役割を担う。非ストレス状態では、Nrf2 は、センサータンパク質である Keap1 (Kelch ECH associated protein 1) によって細胞質に係留されている (Itoh et al. 1999)。また、Keap1 は、E3 ユビキチンリガーゼである Cul3 (culin3) とも相互作用し、Nrf2 のユビキチン化を誘導するため、Nrf2 の半減期はおよそ 20 分と短い (Cullinan et al. 2004; Furukawa and Xiong 2005; Itoh et al. 2003; Kobayashi et al. 2004)。しかし、細胞が酸化ストレスを受けると、まず、MAPK (mitogen-activated protein kinase) 経路や PKC (protein kinase C)、PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase) といった酸化ストレス応答性のセンサータンパク質が活性化し、Keap1 と Nrf2 の双方をリン酸化する (Huang et al. 2002; Kang et al. 2000)。Keap1 はリン酸化によって構造変化が起こり、Nrf2 との親和性が低下する。一方、Nrf2 はリン酸化によって安定化し、活性化する。続いて、ROS が求電子剤として Keap1 のシステイン残基に作用することで、Keap1 がさらなる構造変化を起こし、Nrf2 が Keap1 との結合から解き放たれる。その結果、Nrf2 は核内に移行し、標的遺伝子の転写を開始する。Nrf2 の標的遺伝子としては *HO-1* (heme oxygenase-1) や *GSTA1*, 2, 3, 5 (glutathione S-transferase A1, 2, 3, 5) が知られており、それぞれの転写産物は ROS 等の求電子剤の中和や、抗酸化物質グルタチオンの生合成に関与する。興味深いことに、多くのがんで Keap1 の不活性化変異や、Keap1 との相互作用を弱めるような Nrf2 の変異が発見されている (Kim et al. 2010; Ohta et al. 2008; Padmanabhan et al. 2006; Shibata et al. 2008)。Nrf2 の分解が抑制され、Nrf2 が恒常的

に活性化することは、がん細胞にストレス耐性をもたらし、がん細胞の生存を促進していると考えられる。

1-2-2 低容量ストレス

これまでの研究では、細胞や個体が致命的な強いストレス（高容量ストレス）を受けた場合に作動する代表的なストレス応答経路についての分子機構がよく解明されている。しかしながら、致死性ではないような弱いストレス（低容量ストレス）に対する細胞応答については、ほとんど理解が進んでいない。この分野の研究が遅れている背景には、低容量ストレスが細胞の表現型に大きな変化を引き起こさないため、応答の有無やその詳細な機構を観察することが困難である点が挙げられる。（図 1-1）。

細胞を取り巻く微小環境は絶えず変化しており、その変化が外因的なストレスとしてはたらくと考えられる。そのため、細胞は致死的な高容量ストレスよりも、生死には直接的な影響を与えない低容量ストレスに高頻度で暴露されていると考えられる。したがって、いまだ明らかになっていない低容量ストレスに対する応答機構を解明することは、生物がどのように恒常性を維持しつつ環境変化に適応しているのかを理解する上で重要である。

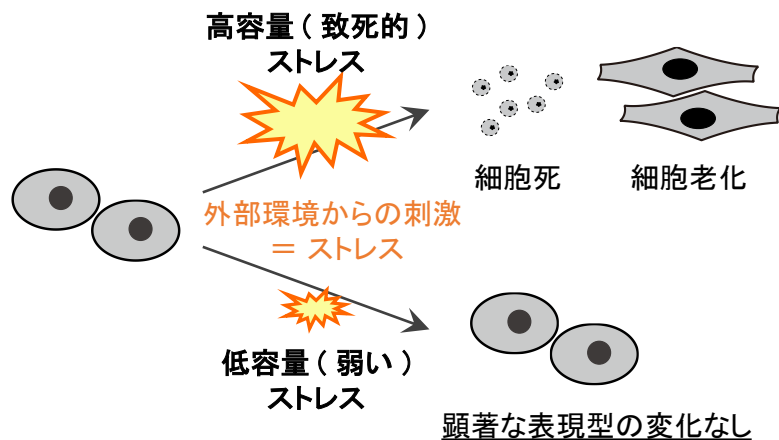


図 1-1 低容量ストレスに対する細胞応答は観察が困難である

外部環境の変化は、細胞にとってストレス刺激となる。細胞は高容量の（致命的な）ストレスに暴露されると、細胞死を起こしたり、細胞老化に陥ったりと、明瞭な表現型を示す。一方、低容量の（弱い）ストレスに晒された場合は、細胞の表現型に明瞭な変化が起こらない。

1-2-3 ホルミシス

ストレスの生体に対する作用は、一般にストレスの強度と単純に正の相関関係にあると考えられがちだが、必ずしもそうではない。興味深いことに、ある種のストレスは、

強く負荷された場合には生体に有害となる一方で、弱く与えられた場合には生体にとってむしろ有益な効果をもたらすことが知られており、この現象はホルミーシスと呼ばれる（図 1-2、総説として、(Calabrese et al. 2011)）。ホルミーシスの具体例として、軽度の酸化ストレスや温度上昇が細胞内のシグナル伝達経路を活性化し、細胞の修復能力や代謝を亢進させることが報告されている (Nitti et al. 2022; Sarup et al. 2016)。また、食事制限によるカロリー制限はホルミーシスの一形態として有名であり、カロリー制限をした生物が自由摂食の対照群に比べて長寿になることは 90 年近く前から観察されている (McCay et al. 1989)。ヒトにおける研究でも、長期間のカロリー制限が有益な効果をもたらすことが示されている。例えば、6 年間におよぶカロリー制限により、アテローム性動脈硬化のリスクが低下する (Fontana et al. 2004)、加齢に伴う心臓拡張機能の衰えが回復する (Meyer et al. 2006) といった報告がある。これらの結果は、適度なカロリー制限は、ホルミーシス反応による寿命延長や加齢性変化の抑制といった有益な効果をもたらすと解釈できる。ホルミーシス反応にみられるように、細胞及び生体は低容量のストレスに対する反応経路を備えており、その反応は生物の生存と進化に貢献してきたと考えられる。しかしながら、これらの応答の分子機構は十分に解明されておらず、さらなる研究が求められている。

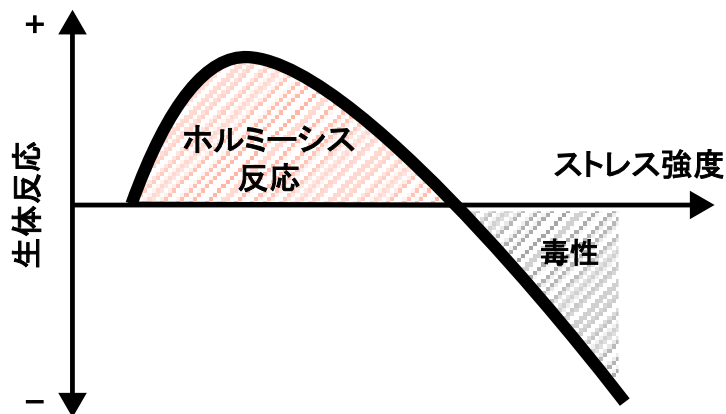


図 1-2 弱いストレスによるホルミーシス効果

ストレスに対する生体反応は、ストレスの強度依存的な二相性の反応になることがある。強いストレスは生体にとって有害である一方で、適度に弱いストレスは、生体に有益な影響をもたらす場合がある。弱いストレスによるホルミーシス反応としては、細胞の増殖活性、代謝亢進、ストレス抵抗性、寿命延長などが知られている。

1-2-4 獲得耐性／交差耐性

弱いストレスに曝された細胞が一過的にストレス抵抗性を獲得し、引き続いて致死的なストレスを受けても生存しうることが知られている。この現象は獲得耐性と呼ばれ、ホルミーシス反応のひとつとして理解されている（図 1-3）。獲得耐性の観察において、はじめに与えられる弱いストレスはプライミングストレスと呼ばれる。また、プライミングストレスと、その後に与えられる致死ストレスの種類が異なる場合でも耐性が誘導されることがあり、これを交差耐性と呼ぶ。獲得耐性及び交差耐性は、プライミングストレスに応答して細胞が発現する現象であるから、細胞が低容量ストレスに応答する仕組みの一つであると考えられる。さらに、細胞応答の結果を致死ストレス後の細胞の生存状態として観察することができるため、実験的な解析が容易である。このことから、獲得耐性の表現型は、1-2-2 項で指摘した課題を解決する手段としても有用であり、細胞の低容量ストレスに対する応答を研究するうえで重要なモデルとなる。

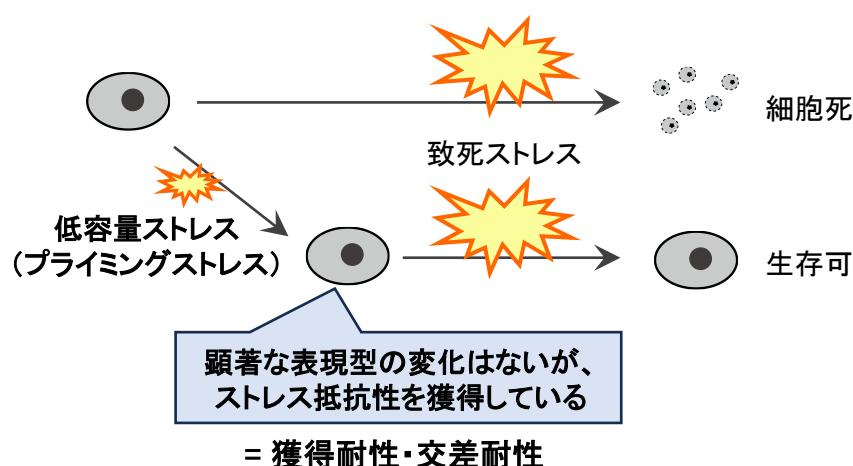


図 1-3 獲得耐性と交差耐性

低容量ストレス（プライミングストレス）を受けた細胞は、外観には大きな変化がないが、一過的なストレス抵抗性を獲得している。そのため、プライミングストレスの直後に、通常であれば細胞死を起こすような致死ストレスに曝されても生存することができる。この現象を獲得耐性と呼ぶ。プライミングストレスとは異なる種類の致死ストレスに対しても抵抗性を獲得する場合があります、これを交差耐性と呼ぶ。事前の低容量ストレス処理の有無によって、致死ストレス処理後の細胞の表現型に明確な差が出るため、獲得耐性の実験系を活用することで、低容量ストレスに対する細胞の反応を観察することが容易になる。

1-2-5 分裂酵母における交差耐性欠損株の原因遺伝子

獲得耐性及び交差耐性は、細胞レベルだけでなく個体レベルにおいても、さまざまな

生物種で報告されている。しかし、その分子機構は十分には解明されていない。こうした背景のもと、著者が所属した研究室の先行研究では、樽本雄介博士と中條萌絵子博士によって、交差耐性に欠損を示す分裂酵母株のスクリーニング及び原因遺伝子の同定が行われた (Chujo et al. 2012; Tarumoto et al. 2013)。この研究では、アルキル化剤であるニトロソグアニジンを用いて変異を導入した分裂酵母に対し、まず一次スクリーニングでは、プライミングストレスとして低容量の熱ストレスを、その後に致死ストレスとして酸化ストレスを与えることで交差耐性を観察した。その結果、生育できなかった株を交差耐性欠損株の候補とした。次に、二次スクリーニングでは、プライミングストレスとして浸透圧ストレスを、致死ストレスとして酸化ストレスを組み合わせ、この条件でも交差耐性が確認されなかった変異株を交差耐性欠損株として特定した。得られた交差耐性欠損株の一つを解析した結果、ヒストンシャペロン HIRA の構成因子をコードする遺伝子が原因遺伝子であることが明らかになった。この発見は、獲得耐性及び交差耐性の分子機構を理解するうえで重要な知見を提供する。

1-3 ヒストンシャペロン HIRA

1-3-1 HIRA の構造と機能

交差耐性の原因遺伝子として同定されたヒストンシャペロン HIRA は、多くの真核生物で高度に保存されている。HIRA は複合体を形成し、分裂酵母では Hip1、Slm9、Hip3 及び Hip4、哺乳類では HIRA、CABIN1 (calcineurin binding protein 1) 及び UBN1 (ubiquitin 1) からそれぞれ構成されている (Rai et al. 2011) (図 1-4)。HIRA は、ヒストン H3 のバリエーションである H3.3 をクロマチンに動員するヒストンシャペロンとして機能し、DNA 複製非依存的にヌクレオソームの構成を調整する (Goldberg et al. 2010; Ray-Gallet et al. 2002; Tagami et al. 2004)。HIRA 複合体によるヒストン H3.3 の動員は、特に遺伝子のプロモーター領域やエンハンサー領域でみられ、遺伝子の転写量と相関することが報告されている (Pchelintsev et al. 2013)。HIRA が遺伝子発現を活性化する例として、哺乳類細胞におけるウイルス遺伝子の発現制御 (Placek et al. 2009)、骨格筋分化調節因子 MyoD の活性制御 (Yang et al. 2011)、血管新生時の血管内皮増殖因子受容体 (vascular endothelial growth factor receptor: VEGFR) の発現制御 (Dutta et al. 2010) などが挙げられる。また、DNA 損傷によって転写が阻害された際に、HIRA は損傷部位の識別と転写の再活性化にも関与している (Adam et al. 2013)。これらの知見は、HIRA が様々な場面においてクロマチン構造の制御を介した遺伝子発現の制御に貢献していることを示している。

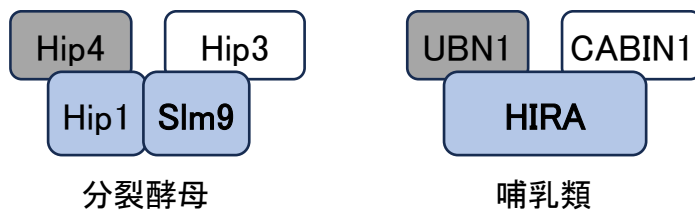


図 1-4 哺乳類及び分裂酵母の HIRA 複合体

HIRA 複合体は、分裂酵母では Hip1、Slm9、Hip3 及び Hip4 の 4 因子から、哺乳類では HIRA、CABIN1 及び UBN1 の 3 因子から構成される。分裂酵母において交差耐性欠損株の原因遺伝子として同定された Slm9 は、哺乳類では HIRA タンパク質の一部として保存されている。

1-3-2 ヒストン H3.3 と遺伝子発現調節

ヌクレオソームは、ヒストン H2A、H2B、H3、H4 の 4 種類のコアヒストンが 2 分子ずつ含まれるヒストン八量体に、約 147 bp の DNA が巻きついて形成される。このヌクレオソーム構造は、真核生物のゲノム DNA を効率よくパッケージングして安定的に保存するとともに、ヌクレオソームの再配置を通じて遺伝子発現を調節する重要な役割を担っている。

ヒストン H3 には、進化的に保存された代表的な 3 つのバリエーション H3.1、H3.2 及び H3.3 が存在する。標準型である H3.1 及び H3.2 は、ヒストン遺伝子クラスター内の複数の遺伝子コピーによってコードされ、主に細胞周期 S 期に合成され、DNA 複製依存的にゲノム全体に取り込まれる。対照的に、非標準型のバリエーションである H3.3 は、ヒトでは独立した 2 つの遺伝子 *H3F3A* 及び *H3F3B* によってコードされ、細胞周期に依存せず発現し、DNA 複製非依存的に、転写や DNA 損傷修復などのヒストンのターンオーバーが必要なときにクロマチンに取り込まれる。分裂中の細胞において、ヒストン H3.3 を含むヌクレオソームの割合は 20%程度であると示されている (McKittrick et al. 2004)。

ヒストン H3.3 のアミノ酸配列は、標準型であるヒストン H3.1 及び H3.2 とそれぞれ 5 個及び 4 個しか違わないが、これらのアミノ酸の違いが、各ヒストンに特異的なシャペロンとの結合に関与している (Liu et al. 2012; Ricketts et al. 2015)。ヒストン H3.3 の取り込みを媒介するヒストンシャペロンには、HIRA 複合体と DAXX 複合体がある。HIRA 複合体は活発に転写されている遺伝子での H3.3 の取り込みに関与し、DAXX 複合体はセントロメア周辺やサブテロメア領域などヘテロクロマチンでの H3.3 の取り込みを制御する (Goldberg et al. 2010)。ヒストン H3.3 及びヒストン H2A のバリエーションである H2A.Z を含むヌクレオソームは、標準的なヒストンを含むヌクレオソームに比べて安定性が低く、クロマチン中における可動性が高い (Jin and Felsenfeld 2007)。この特性により、ヒストン H3.3/H2A.Z を含むヌクレオソームは、転写が活性化しているプロモーターのヌクレオソームフリー領域に見られ、転写因子や他のクロマチン制御因子が DNA

にアクセスすることを容易にしていると考えられる (Jin et al. 2009)。そのため、エンハンサー領域、プロモーター領域並びに遺伝子の転写領域に見られるヒストン H3.3 は転写活性化の目印となる。ヒストン H3.3 には転写活性化の翻訳後修飾が多くみられることも知られており、エンハンサー領域や転写開始点付近でみられるヒストン H3 の 4 番目のリジンのモノメチル化及びトリメチル化 (それぞれ H3K4me、H3K4me3)、並びに 9 番目、14 番目及び 27 番目のリジンのアセチル化 (それぞれ H3K9ac、H3K14ac、H3K27ac)、あるいは遺伝子の転写領域にみられる 36 番目のリジンのトリメチル化 (H3K36me3) がその代表例である (Goldberg et al. 2010; Pchelintsev et al. 2013)。さらに、ヒストン H3.3 及びその修飾が、遺伝子の活性化状態をエピジェネティックに記憶するマーカーとして働くことが報告されている (Ng and Gurdon 2008)。一方、HIRA 依存的なヒストン H3.3 の取り込みが必ずしも転写の活性化とは相関せず、ポリコーム抑制性複合体 2 (polycomb repressive complex 2: PRC2) のリクルートを促進し、ヒストン H3 の 27 番目のリジンのトリメチル化 (H3K27me3) を導入することで遺伝子の転写を抑制することも報告されている (Banaszynski et al. 2013)。これらの研究結果から、ヒストン H3 のバリエーションである H3.3 は、遺伝子発現の活性化と抑制を制御するためのクロマチン上の目印として、おそらく細胞の状況依存的に複雑な役割を果たしていることが示唆される。

さらに、興味深いことに、ヒストン H3.3 の変異が複数のがんで見ついている。特に翻訳後修飾をうけるアミノ酸残基 K27、G34 及び K36 の変異が、小児びまん性内在性橋神経膠腫 (diffuse intrinsic pontine glioma: DIPG) や小児神経膠芽腫、並びに軟骨芽細胞腫や骨巨細胞腫において頻繁に観察されている (Behjati et al. 2013; Cleven et al. 2015; Khuong-Quang et al. 2012; Schwartzentruber et al. 2012; Wu et al. 2012)。これらの知見は、ヒストン H3.3 を介した遺伝子発現の制御が細胞の正常な恒常性の維持に重要であることを示唆している。

1-4 本研究の目的

細胞のストレス応答機構は極めて複雑であり、その全容は未だ十分に解明されていない。本研究では、哺乳類細胞における低容量ストレス応答の機構を明らかにするため、獲得耐性に注目し、ヒストンシャペロン HIRA の役割を解明することを目的とした。

ストレス応答についての従来の研究では、主にストレスセンサータンパク質や転写因子による個々の遺伝子の発現調節に焦点が当てられていた。それらの応答機構とは異なり、HIRA はクロマチン構造を包括的に制御することで広範な遺伝子群の発現を調節している可能性が考えられた。そのため、低容量ストレス応答における HIRA の機能を解明することは、細胞がストレス条件下で大規模に転写調節を行い、環境変化に適応する仕組みの分子基盤を理解することにつながる。

第二章

材料と方法

2-1 試薬、化合物

本研究では、特に記さない限り、試薬はナカライテスク社、酵素はタカラバイオ社の製品を用いた。ストレス処理、並びに特定の因子の阻害剤あるいは活性化剤として次の化合物を使用した。それぞれ、各図で示した終濃度になるよう培地へ添加された。過酸化水素水(WAKO, 7722-84-1)、Echinomycin (Sigma-Aldrich, SML0477)、Chrysin (Santa Cruz, sc-204686)、Acriflavine 塩酸塩 (Sigma-Aldrich, A8251)、及び Anisomycin (Sigma-Aldrich, A9789)

2-2 細胞

ヒト胎児肺由来正常線維芽細胞である WI-38 細胞にヒトテロメラーゼの触媒サブユニット (human telomerase reverse transcriptase: hTERT) を過剰発現させることで不死化した WI-38-hTERT 細胞を作製した。WI-38 細胞、WI-38-hTERT 細胞、ヒト胎児肺由来正常線維芽細胞 IMR-90、ヒト子宮頸がん由来細胞 HeLa、並びにヒト胎児腎臓由来細胞 293T 及び 293FT は、0.16%炭酸水素ナトリウム、2 mM L-グルタミン (Sigma-Aldrich)、10%ウシ胎児血清 (Gibco)、96 U/ml ペニシリン G (Sigma-Aldrich) 及び 72 U/ml ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM) (ニッスイ) を用いて、5%二酸化炭素の存在下、37°Cで培養した。293T 細胞は米原伸教授 (京都大学) より分与いただいた。

2-3 熱ストレスアッセイ

細胞を 1.0×10^5 cells (WI-38-hTERT 細胞と HeLa 細胞の場合) または 1.5×10^5 cells (WI-38 細胞と IMR-90 細胞の場合) /35 mm ディッシュの密度で播種し、37°C で 24 時間培養した。プライミングストレス処理を与えるために、培養培地を 40°C で予熱した新鮮な DMEM に交換し、40°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) で 2 時間培養した。致死ストレス処理を与えるためには、培養培地を 47°C で予熱した新鮮な DMEM に交換し、47°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) で 35 分間培養した。熱ストレス処理後、培養培地を新鮮な 37°C の DMEM に交換し、37°C で 48 時間培養した。細胞生存率は Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所、347-07621) を用いて計測した。キット溶液に含まれる水溶性テトラゾリウム塩は、生細胞中の脱水素酵素によって還元され、橙色の水溶性ホルマゼンを生じることから、反応後溶液の吸光度が生細胞数に対応する。培養後の培地を 10% Cell Counting Kit-8 溶液を含む DMEM に交換し、1.5 ~ 3 時間培養した。その後、マイクロプレートリーダー SpectraMax 340 Microplate Reader (Molecular Devices) を用いて 450 nm の吸光度を測定した。生存率は、無処理の細胞の測定値を基準とし、相対値を算出して示した。

2-4 レンチウイルス感染による遺伝子導入

プラスミド DNA は Gene Elute Plasmid Midiprep Kit (Sigma-Aldrich) を用いて精製し、

-20°C で保存した。293T 細胞を 1.0×10^6 cells/60 mm ディッシュの密度で播種し、24～36 時間培養した後、細胞密度が 90%程度になったことを確認し、リン酸カルシウム法によりレンチウイルス RNAi ベクターとレンチウイルスパッケージングベクター (pCMV-VSV-G-RSV-Rev 及び pCAG-HIVgp) を遺伝子導入した。遺伝子導入から 12 時間後に新鮮な DMEM に交換し、さらに 24 時間培養を行った。レンチウイルス培養上清を回収後、0.45 μ m フィルター (Merck Millipore) で濾過した後、Polybrene (Sigma-Aldrich) を 5 μ g/ml になるように添加してウイルス溶液とした。標的細胞である WI-38-hTERT 細胞を 2.5×10^5 cells/60 mm ディッシュの密度で播種し、24 時間後に培養培地を DMEM で 2 倍に希釈したウイルス溶液に交換することでウイルス感染を行った。24 時間後に培養培地を、2.5 μ g/ml ビューロマイシンを含む新鮮な DMEM に交換し、3 日間薬剤選択を行った。

レンチウイルス RNAi ベクター pCSII-RNAi-MCS-CMV-puro には、shHIRA#2 (5'-GGAGATGACAACTGATTA-3') 及び shLuciferase (5'-TAAGGCTATGAAGAGATAC-3') をそれぞれ挿入した。

テトラサイクリン誘導性レンチウイルス RNAi ベクター pCSII-U6tet-shRNA-EF-TetR-IRES-puro には、shHIRA#14 (5'-GCTAACTTGTAATATTGAA-3') 及び shControl (5'-CCAATGCTTTGATGCCAAA-3') をそれぞれ挿入した。細胞へのウイルス感染による遺伝子導入後、shRNA の発現を誘導するために、培養培地中にテトラサイクリン系抗生物質であるドキシサイクリン (Sigma-Aldrich, D3447) を終濃度 1 μ g/ml となるように添加し、少なくとも 6 日間培養した。

レンチウイルス RNAi ベクター及びレンチウイルスパッケージングベクターは、いずれも米原伸教授 (京都大学) より分与いただいた。

2-5 siRNA

ノックダウンする標的遺伝子に対する siRNA 10～30 pmol と、5 μ L の Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen, 13778030) を 500 μ L の無血清培地 Opti-MEM (Gibco) 中で混合し、室温で 15 分間インキュベートすることで siRNA 溶液を調製した。標的細胞である WI-38-hTERT 細胞を 1.0×10^5 cells/35 mm ディッシュの密度で播種した直後に siRNA 溶液を添加し、37°C で 24 時間培養し、以降の実験に供した。本研究で使

Stealth siHIF1A (Invitrogen, HSS104775 及び HSS179231、それぞれ終濃度 5 nM)
Stealth RNAi siRNA Negative Control, Med GC (Invitrogen, 12935330、終濃度 5 nM)
siATF2 (Santa Cruz, sc-29205、終濃度 15 nM)
siATF4 (5'-CCACGUUGGAUGACACUUG-3'、終濃度 15 nM)
siHSF1 (5'-UAUGGACUCCAACCUGGAUAA-3'、終濃度 15 nM)
siHSP70 (5'-CGACGGAGACAAGCCCAAG-3'、終濃度 15 nM)

siLuciferase (5'-CUUACGCUGAGUACUUCGA-3'、終濃度 15 nM)

2-6 マイクロアレイによる遺伝子発現解析

HIRA ロックダウン細胞及びコントロール細胞から、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, 74104) 及び QIAshredder (QIAGEN, 79656) を用いて、添付のプロトコルに従って全 RNA を抽出した。抽出した全 RNA の品質管理として、Agilent RNA6000 Nano Kit (Agilent Technologies, 5067-1511) 及び Agilent 2100 バイオアナライザ電気泳動システム (Agilent Technologies) を用いて RIN (RNA integrity number) の測定を行い、RNA が分解されていないことを確認した。100 ng の全 RNA と GeneChip Human Gene 2.0 ST Array (Affymetrix, 902112) を用いて、マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的な測定を添付のプロトコルに従って行った。取得された遺伝子発現データをもとに、RMA (robust multichip analysis) アルゴリズムによってサンプル間のバイアスを補正した後、マイクロアレイデータ解析ソフトウェア GeneSpring (Agilent Technologies) を用いて各遺伝子の発現量の数値化とサンプル間の発現量の比較解析を行った。

2-7 定量 RT-PCR

2-6 項と同様の手順で培養細胞から全 RNA を抽出し、AMV Reverse Transcriptase (Life Sciences) 及びオリゴ dT プライマーを用いて cDNA を調製した。逆転写産物である cDNA、プライマー及び SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, 4309155) を添付のプロトコルに従って混合し、StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム PCR を行った。使用したプライマーのヌクレオチド配列は次のとおりである。

HSPA1A: 5'-TGCAGGAGGCGGAGAAGTACAAAG-3',
5'-TCCACGGCGCTCTTCATGTTG-3'
HSPA4L: 5'-CGGAGAGGACCAACCTAAAC-3',
5'-TCTCTTCATGCTCCATGTACTTC-3'
HSPA5: 5'-ACAGTGGTGCCTACCAAGAAG-3',
5'-CAGTCAGATCAAATGTACCCAGAAG-3'
CAT: 5'-GGAGAAGTGCGGAGATTCAACAC-3',
5'-CTCACACAGACGTTTCCTCTGTTC-3'
HMOX1: 5'-GCTGCTGACCCATGACACCAAGG-3',
5'-AAGGACCCATCGGAGAAGCGGAG-3'
SOD1: 5'-TGTGGCCGATGTGTCTATTGAAG-3',
5'-TGCCCAAGTCATCTGCTTTTTC-3'
SOD2: 5'-CTGGACAAACCTCAGCCCTA-3',
5'-TGATGGCTTCCAGCAACTC-3'

GSR: 5'-GACTTGGGTGTGATGAAATGC-3',
 5'-CTGAAGAGGTAGGGTGAATGG-3'
GSTM2: 5'-CCAAGTATTTGAGCCCAGCTGC-3',
 5'-TTGCCCCAGACAGCCATCTTT-3'
NQO1: 5'-CAGTGGTTTGGAGTCCCTGCC-3',
 5'-TCCCCGTGGATCCCTTGCAG-3'
TXN: 5'-TTTCAGGAAGCCTTGGACGCT-3',
 5'-GCAACATCCTGACAGTCATCCAC-3'
HIF1A: 5'-CTCATCCAAGAAGCCCTAACG-3',
 5'-TCGCTTTCTCTGAGCATTCTG-3'
HSF1: 5'-CTGCGGGAGAGTGAACCTG-3',
 5'-GAGCTCATTCTTGTCCAGGCAG-3'
ATF2: 5'-CATGCAGAAGAAATCTGGCTATC-3',
 5'-ATGTGCTGACCGAACTATGC-3'
ATF4: 5'-TCAGTCCCTCCAACAACAGC-3',
 5'-TCTGGCATGGTTTCCAGGTC-3'
GAPDH: 5'-CCTGCACCACCAACTGCTTAG-3',
 5'-GGTCATGAGTCCTTCCACGATAC-3'
b-Actin: 5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3',
 5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'

2-8 クロマチン免疫沈降(chromatin immunoprecipitation: ChIP)

WI-38-hTERT 細胞を 1.7×10^6 cells/150 mm ディッシュの密度で播種し、37°C で 24 時間培養した。プライミングストレスを処理した細胞と無処理の細胞を、ディッシュ 3 枚ずつ用意した。ストレス処理後、ホルムアルデヒドを終濃度 1% となるよう培養培地に加え、室温で 8 分間静置し、細胞を固定した。終濃度 125 mM のグリシンで 3 分間中和し、氷冷 PBS で 2 回洗浄した後、終濃度 1 mM の PMSF を含む氷冷 PBS を添加し、セルスクレーパー(住友ベークライト)を用いて細胞を回収した。回収した細胞を遠心(4°C、4,000 rpm、5 分間) 後、上清を除去し、Lysis バッファー1 (50 mM HEPES-KOH [pH 7.4]、140 mM NaCl、1 mM EDTA、10%グリセロール、0.5% NP-40、0.25% Triton X-100 及び 1 mM PMSF)、Lysis バッファー2 (20 mM Tris-HCl [pH 8.0]、200 mM NaCl、1 mM EDTA、0.5 mM EGTA 及び 1 mM PMSF)、Lysis バッファー3 (20 mM Tris-HCl [pH 7.5]、150 mM NaCl、1 mM EDTA、0.5 mM EGTA、1% Triton X-100、0.1% sodium deoxycholate (Sigma-Aldrich)、0.1% SDS 及び 1×Complete (Roche)) 及び Lysis バッファー4 (20 mM Tris-HCl [pH 7.5]、500 mM NaCl、1 mM EDTA、0.5 mM EGTA、1% Triton X-100、0.1% sodium deoxycholate (Sigma-Aldrich)、0.1% SDS 及び 1×Complete (Roche)) で順次溶解した。超

音波ホモジナイザー Branson Sonifier 250 を用いて細胞溶解液を 30 秒間処理した後に遠心 (4°C、10,000 rpm、1 分間) する操作を 8 回繰り返すことで、細胞溶解液中に含まれるゲノム DNA を 100~500 bp のサイズに断片化した。最後に、細胞溶解液を遠心 (4°C、15,000 rpm、15 分間) し、上清を全細胞抽出液として免疫沈降に供した。また、全細胞抽出液の一部は input サンプルとして取り置いた。事前に 0.5% BSA/ PBS でブロッッキング処理をした磁気ビーズ (Dynabeads M-280 Sheep Anti-Rabbit IgG (Invitrogen, 11203D)、Dynabeads M-280 Sheep Anti-Mouse IgG (Invitrogen, 11202D) または Dynabeads Sheep Anti-Rat IgG (Invitrogen, 11035)) と一次抗体を結合させ、全細胞抽出液を加えて 4°C で一晩インキュベートした。非特異的に結合したタンパク質を除去するため、反応後のビーズを RIPA バッファー (50 mM HEPES-KOH [pH 7.4]、500 mM LiCl、1 mM EDTA、1% NP-40 及び 0.7% sodium deoxycholate) で 5 回洗浄し、TE バッファー (50 mM Tris-HCl [pH 8.0] 及び 10 mM EDTA) で 1 回洗浄した。ビーズに Elution バッファー (50 mM Tris-HCl [pH 8.0]、10 mM EDTA 及び 1% SDS) を加え、65°C で 20 分間インキュベートすることで、ビーズから DNA-タンパク質複合体を溶出させた。溶出したサンプル及び input サンプルを 65°C で一晩逆架橋させた後、RNase A 及び Proteinase K で処理し、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, 28104) を用いて精製した。得られた DNA とプライマー及び SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, 4309155) を添付のプロトコルに従って混合し、StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム PCR を行った。結果は、免疫沈降後に濃縮された DNA 量を、input サンプルに含まれる DNA 量に対する相対値として示した。さらに、ヒストン H3.3 及びヒストン翻訳後修飾の免疫沈降のデータは、総ヒストン H3 の免疫沈降のデータによって正規化した。

免疫沈降に使用した抗体は次のとおりである。抗 histone H3 抗体 (Abcam, ab1791)、抗 histone H3.3 抗体 (Cosmo Bio, CE-040B)、抗 RNA polymerase II clone CTD4H8 (Millipore, 05-623) 及び抗 MED1 抗体 (BETHYL, A300-793A) はそれぞれ市販品を使用した。HIRA に対する抗体は、自作したウサギポリクローナル抗体 (結果 3-4-1 項) を使用した。抗 histone H3K4me 抗体、抗 histone H3K4me2 抗体、抗 histone H3K4me3 抗体、抗 histone H3K9ac 抗体及び抗 histone H3K9/K27ac 抗体は、木村宏教授 (東京工業大学) から分与いただいた (Kimura et al. 2008)。陰性対照として、正常ウサギ IgG (Santa Cruz, sc-2027)、正常マウス IgG (Santa Cruz, sc-2025) 及び正常ラット IgG (Santa Cruz, sc-2026) を使用した。また、リアルタイム PCR に使用したプライマーのヌクレオチド配列は次のとおりである。

HSPA1A_-2kb: 5'-CGCACCCGGCCTATATACAT-3',
5'-CCATGACAGTAGCGTCTCCA-3'
HSPA1A_TSS: 5'-TGCTGCGACAGTCCACTAC-3',
5'-CGAGAAGAGCTCGGTCCTTC-3'
HSPA1A_ORF: 5'-GGACATCAGCCAGAACAAGC-3',

5'-GAAGTCGATGCCCTCAAACAG-3'
 HSPA1A_TTS: 5'-GGTCAGTAGGGTCTGCATAGG-3',
 5'-CTGGAGGATAACCATTGTCTAACAC-3'
 HSPA5_TSS: 5'-CAATGAACGGCCTCCAACGAG-3',
 5'-GGTCAATCTGTCTGTGCTGTCTTG-3'
 HSPA5_ORF: 5'-AGAAACCGCTGAGGCTTATTTG-3',
 5'-TTCTATACATAACAGCCAACCGAG-3'
 HSPA5_TTS: 5'-ACCACCTAGTCTGTAACCTTTCTG-3',
 5'-TCACAAAGTTGCAATATGGTTAGGG-3'
 GAPDH_TSS: 5'-CACGTAGCTCAGGCCTCAAGAC-3',
 5'-GGAGGCTGCGGGCTCAATTTATAG-3'
 GAPDH_ORF: 5'-AAAGCCTGCCGGTGACTAAC-3',
 5'-CATCACCCGGAGGAGAAATCG-3'

2-9 クロマチン免疫沈降シーケンシング (ChIP sequencing: ChIP-seq)

2-8 項の免疫沈降後サンプル及び input サンプルから精製した DNA をもとに、NEBNext ChIP-seq Library Kit (New England Biolabs) を用いて、製品プロトコルに従って ChIP-seq ライブラリーを調製した。生成されたライブラリーは、HiSeq 2000 DNA シーケンサー (Illumina) でシーケンスされた。各サンプルから得られた配列データ (リード) の品質は、FastQC プログラム (v0.11.3) を用いて確認した。各サンプルについて約 4,500 万個のリードを、ショートリードマッピングツール Bowtie (v1.1.1) (Langmead et al. 2009) を使用してヒトゲノム (UCSC, hg19) にマッピングした。マッピングでは、最大 2 bp のミスマッチを許容し、ゲノム上の特定の 1 か所のみにマッピングされるリードだけを採用した。ピークの検出には、DROMPA2 ソフトウェア (v2.6.4) (Nakato et al. 2013) をデフォルトの設定 (各 100-bp ビンにおける ChIP/input の比率に対して $p < 0.001$ かつ FDR (false discovery rate) < 0.01 を有意とする) で使用した。得られたピークは、ゲノムデータの可視化ツール IGV (v2.3.57) (Robinson et al. 2011) を用いて視覚化した。

2-10 ChIP-seq のデータ解析

2-10-1 MA プロット

HIRA の ChIP-seq データにおいて、得られた各ピークを、ストレス処理特異的ピーク、無処理特異的ピーク及び重複ピークの 3 グループに分類した。重複ピークは、ストレス処理サンプルで見られたピークのうち、無処理サンプルで見られたピークと 1 bp 以上重なるピークと定義した。DROMPA2 ソフトウェア (v2.6.4) を用いて、各ピークに含まれるリード数を取得し、次の式に従って (M, A) 値を算出し、プロット図を作成した。

リード数のログ比 $M = \log_2$ (ストレス処理のリード数 / 無処理のリード数)

平均リード数 $A = 0.5 \times \log_2 (\text{ストレス処理のリード数} \times \text{無処理のリード数})$

2-10-2 パスウェイ解析

HIRA の ChIP-seq データで得られたピークのうち、ゲノムにマッピングされたときにいずれかの遺伝子の転写開始点から 2,000 bp 以内に位置するピークを抽出し、対応する遺伝子情報を付加した。これらのピークのうち、2-10-1 項で算出した M 値が高い上位 2,000 個及び M 値が低い下位 2,000 個のピークをリストアップし、それらに対応する遺伝子のリストをもとに、パスウェイ解析ソフトウェア Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN) を用いてパスウェイ解析を行った。

2-10-3 モチーフ解析

HIRA の ChIP-seq データから、各ピークの頂点から前後 250 bp の領域を抽出し、塩基配列を相同性検索プログラム Blast+を用いて取得した。解析ツール MEME Suite (v5.0.3) (Bailey et al. 2009) の MEME-ChIP プログラムを用いて、各ピークに含まれる配列モチーフの検索を行った。モチーフ検索の設定として、基準となる配列モチーフには JASPAR CORE 2014 データベースを使用し、検索するモチーフの配列幅は 6 ~ 30 bp とした。

2-11 免疫沈降(immunoprecipitation: IP)

培養中の WI-38-hTERT 細胞または 293FT 細胞を PBS で洗浄した後、終濃度 1 mM の PMSF を含む PBS を添加し、セルスクレーパー（住友ベークライト）を用いて細胞を回収した。回収した細胞を遠心（4°C、4,000 rpm、5 分間）後、上清を除去し、EBC バッファー（50 mM Tris-HCl [pH 8.0]、300 mM NaCl、0.5% NP-40、PhosSTOP (Sigma-Aldrich) 及び 1×Complete (Roche)）で溶解した。超音波ホモジナイザー Branson Sonifier 250 を用いて細胞溶解液の粘性がなくなるまでソニケーション処理を行い、全細胞溶解液（whole cell lysate: WC）を調製した。全細胞溶解液を遠心（4°C、15,000 rpm、10 分間）し、上清を全細胞抽出液として免疫沈降に供した。また、全細胞抽出液の一部は input サンプルとして取り置いた。全細胞抽出液に抗体を加えて 4°C で一晩インキュベートした後、Protein G Sepharose (GE Healthcare) を添加したさらに 4°C で 5 時間インキュベートした。反応後のサンプルを遠心（4°C、3,000 rpm、1 分間）し、上清を IP sup サンプルとして取り置いた。回収したビーズを EBC バッファーで 3 回洗浄し、2×SDS サンプルバッファー（125 mM Tris-HCl [pH 6.8]、4% SDS、20%グリセロール、2% 2-メルカプトエタノール及びブロモフェノールブルー）を添加し、免疫沈降 (IP) サンプルとした。WC、input、IP sup 及び IP サンプル中に含まれる対象タンパク質を、ウェスタンブロッティング法により検出した。

使用した抗体は次のとおりである。抗 HIRA 抗体(クローン WC15: Active motif, 39555)、

抗 HIRA 抗体 (Abcam, ab129169) 及び自作した抗 HIRA ウサギポリクローナル抗体。陰性対照として、正常ウサギ IgG (Santa Cruz, sc-2027) 及び正常マウス IgG (Santa Cruz, sc-2025) を使用した。

2-12 ウェスタンブロッティング

細胞を培養しているディッシュから培養液を取り除き、氷冷 PBS で洗浄後、2× SDS サンプルバッファー (125 mM Tris-HCl [pH 6.8]、4% SDS、20%グリセロール、2% 2-メルカプトエタノール及びブロモフェノールブルー) を添加し、セルスクレーパー (住友ベークライト) を用いて細胞を回収した。回収後、超音波処理により粘性を消失させ、105°C で 5 分間熱変性処理を行い、全細胞抽出液とした。全細胞抽出液を 10% SDS-PAGE ゲル及び SDS-PAGE バッファー (12.5 mM Tris、3.46 mM SDS 及び 2 M glycine) によって展開した後、PVDF メンブレン (Immobilon-P, Millipore) と転写バッファー (24 mM Tris、1.28 mM SDS 及び 40 mM glycine) を用い、電圧 12 V、40 分間のセミドライ法で転写した。3% BSA/TNT バッファー (20 mM Tris-HCl [pH 7.5]、140 mM NaCl 及び 0.05% Tween 20) または Blocking One を用いて室温で 30 分間、メンブレンをブロッキング処理した後、一次抗体反応を 4°C で一晩行った。TNT バッファーでメンブレンを 3 回洗浄した後、二次抗体反応を室温で 1 時間行った。再度 TNT バッファーでメンブレンを 3 回洗浄した後、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いてシグナルを検出した。ウェスタンブロッティングに用いた一次抗体及び二次抗体は次のとおりである。一次抗体はブロッキング剤で、二次抗体は TNT バッファーでそれぞれ至適濃度に希釈した。

一次抗体：抗 HIRA 抗体 (Active Motif, 39557)、抗 Actin 抗体 (Millipore, MAB1501R)

二次抗体：抗 mouse IgG 抗体 (HRP-conjugated, GE Healthcare, NA931)

2-13 統計解析

熱ストレスアッセイ、定量 RT-PCR 及びクロマチン免疫沈降のデータの統計解析には、Microsoft Excel を用いて Student's t-test を行った。

第三章

結果

3-1 ヒト細胞における獲得耐性実験系の構築

3-1-1 熱ストレスによる獲得耐性の検証

ヒト細胞における低容量ストレス応答について解析するため、まず細胞の生死に基づき低容量ストレスの影響を観察できる獲得耐性の実験系の確立を試みた。低容量及び高容量のストレスを使い分けるにあたって、ストレス源が細胞に与える影響が単純かつ明瞭であることが望ましい。この点に関して、薬剤処理は、細胞内への取り込み量や半減期により用量を決定するパラメーターが複雑化するほか、多くの薬剤がオフターゲット効果をもち、複数のシグナル伝達経路に影響を与えるため、細胞のストレス応答を複雑化するという課題がある。一方、熱ストレスは、温度と処理時間による実験条件のコントロールが容易であり、かつ熱ストレスに対する細胞の応答は、熱ショックタンパク質の発現に代表されるように十分に研究されているため、分子機構の解析を進めやすい。したがって、本研究では、低容量のプライミングストレスと高容量の致死ストレスの両方において、主に熱ストレスを使用することとした。また、特に断りのない限り、テロメレース遺伝子導入により不死化したヒト線維芽細胞株 WI-38-hTERT 細胞を使用した。

37°C で培養した細胞に対し、培養培地をあらかじめ 40°C に加温した新鮮な培地に交換し、40°C のインキュベーターで 2 時間培養することでプライミングストレスを与えた。続いて、培養培地をあらかじめ 47°C に加温した新鮮な培地に交換し、47°C のインキュベーターで 35 分間培養することで致死ストレスを与えた。致死ストレス処理後、細胞を通常の培養条件に戻すために、培養培地を 37°C の培地に交換し、37°C で 48 時間培養を続けた。その後、細胞の生存率を Cell Counting Kit-8 試薬を用いた WST 法により測定し、熱ストレス処理を与えていない対照群に対する割合として算出した（図 3-1A）。

40°C で 2 時間のプライミングストレス処理では、細胞の生存率に大きな影響がみられなかったため、この熱ストレス条件は、序論 1-2-2 項で述べた「低容量のストレス」であるとみなすことができる（図 3-1B、図中の「P」）。また、47°C で 35 分間の致死ストレス処理は、生存率が対照群と比較して 25%未満に減少したことから、「高容量のストレス」であるといえる（図 3-1B、図中の「L」）。一方、プライミングストレス直後に致死ストレスを与えた場合、生存率は 50%以上に有意に増加した（図 3-1B、図中の「P+L」）。この結果は、ヒト細胞が低容量のストレスに事前に曝露されることで、高容量のストレスに対する耐性を獲得することを示唆する。さらに、この獲得耐性の現象は、他のヒト細胞株（初代培養で有限寿命である正常ヒト線維芽細胞 WI-38 及び IMR-90、並びにヒト子宮がん由来細胞株 HeLa）においても観察された（図 3-1C-E）。これらの結果より、低容量及び高容量の熱ストレスを利用することで、ヒト細胞においても獲得耐性を正常およびがん細胞株で観察することができた。この実験系を、細胞の低容量ストレスに対する応答を研究するために活用した。

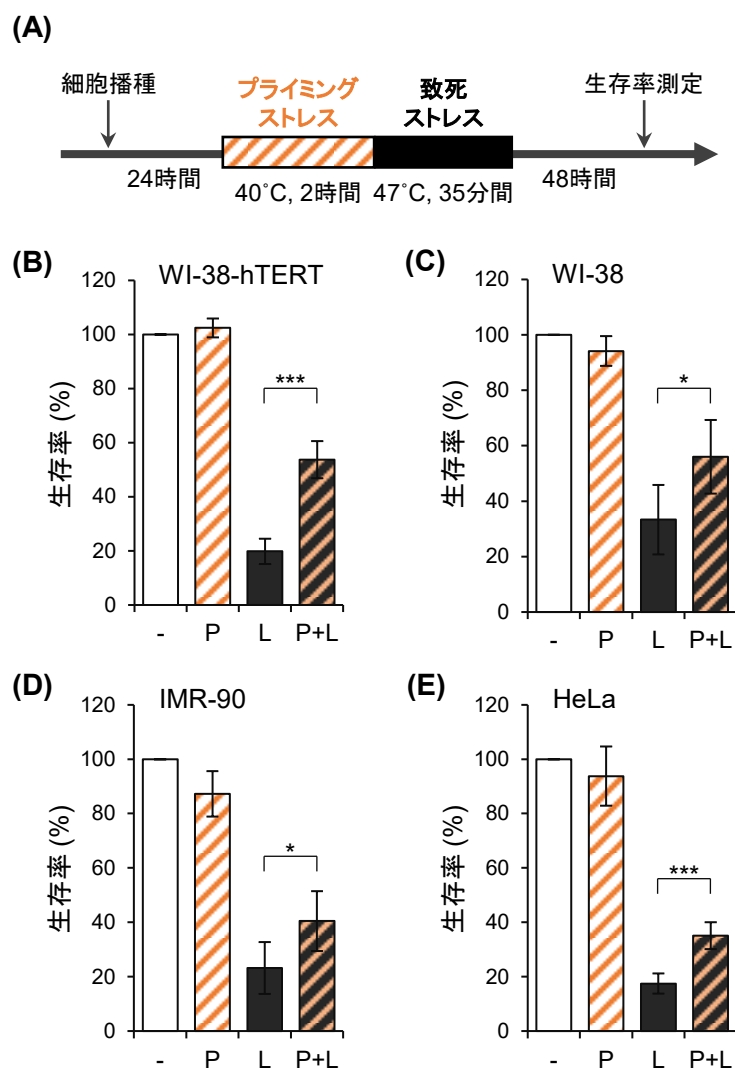


図 3-1 ヒト細胞は熱ストレスに対して獲得耐性を示す

(A) 熱ストレスによる獲得耐性の実験系のタイムコースを示す。細胞を播種してから24時間後に40°C、2時間のプライミングストレスを与え、引き続き47°C、35分間の致死ストレスを与えた。致死ストレス処理から48時間後にCell Counting Kit-8を用いたWST法により細胞の生存率を測定した。

(B-E) 獲得耐性実験系における、WI-38-hTERT細胞 (B)、WI-38細胞 (C)、IMR-90細胞 (D) 及びHeLa細胞 (E) の結果を示す。ストレス処理条件は、各細胞について無処理(-)、プライミングストレス単独(P)、致死ストレス単独(L)及びプライミングストレス+致死ストレス(P+L)の4通りを実施した。生存率は、各細胞における無処理サンプルに対する相対値として示す。データは独立した実験から得られた平均値±標準偏差を示す (B: n=3, C: n=5, D: n=4, E: n=5)。統計解析は両側独立t検定を用いた(*, $p < 0.05$, ***, $p < 0.005$)。

3-1-2 異なるストレス種による交差耐性の検討

分裂酵母では、プライミングストレスと致死ストレスが異なる種類のストレスであっても致死ストレスに対する耐性が誘導されることが確認されており、交差耐性と呼ばれる (Chujo et al. 2012)。ヒト細胞においても同様に交差耐性が観察されるかを検証するため、細胞に熱ストレスによるプライミングストレスを与えた後、過酸化水素あるいは紫外線 (UV) 照射による致死ストレスを与えた。陽性対照群には、熱ストレスによる致死ストレスを与え、各群の致死ストレス処理後 48 時間に細胞の生存率を Cell Counting Kit-8 試薬を用いた WST 法により測定した。

その結果、致死ストレスが熱ストレスであった場合にはプライミングストレス処理による耐性の獲得が観察されたが、過酸化水素及び UV 照射による致死ストレスに対する耐性は認められなかった (図 3-2)。つまり、分裂酵母とは異なり、ヒト細胞にプライミングストレスと致死ストレスを異なるストレス源で与えた場合、少なくとも本実験条件下では交差耐性は観察されなかった。交差耐性がみられなかった要因として、哺乳類細胞のストレス応答機構の複雑性が考えられる。序論 1-2-1 項に記載したように、哺乳類細胞ではストレス源に応じて異なるエフェクタータンパク質が関与するストレス応答経路が働き、各種ストレスによって生じる損傷をより効果的に修復する機構が備わっている。そのため、哺乳類細胞のストレス応答機構はストレスの種類ごとに特化しており、異なるストレス種に対する応答としての交差耐性は限定的である可能性が考えられる。

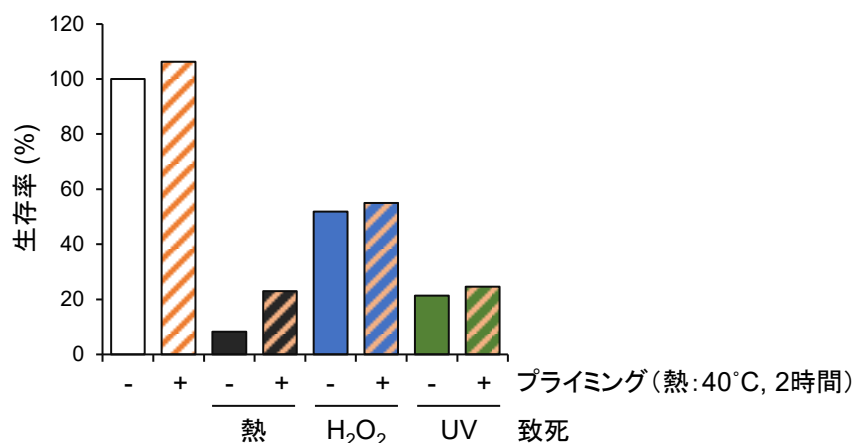


図 3-2 プライミング熱ストレスによる交差耐性は観察されない

WI-38-hTERT 細胞にプライミング熱ストレスと、様々な致死ストレスを与えた際の生存率を示す。40°C、2 時間のプライミング熱ストレスを与えた後、致死ストレスとして熱ストレス (47°C、35 分間)、過酸化水素 (200 μ M H₂O₂)、あるいは紫外線照射 (30 J/m² UV) による処理をそれぞれ行った。致死ストレス処理から 48 時間後に Cell Counting Kit-8 を用いた WST 法により細胞の生存率を測定した。生存率は、無処理サンプルに対する相対値として示す。データは 2 回の独立した実験から得られた平均値を示す。

3-2 ヒストンシャペロン HIRA と獲得耐性の関連性の検証

著者が所属した研究室の先行研究によって、分裂酵母では獲得耐性及び交差耐性にヒストンシャペロン HIRA が必要であることが示された (Chujo et al. 2012)。序論 1-3-1 で述べたとおり、哺乳類においても HIRA が保存されていることから (Rai et al. 2011)、分裂酵母と同様に哺乳類細胞においても HIRA が獲得耐性に必要であるか否かを明らかにする必要がある。そのために、図 1-4 に示す哺乳類 HIRA 複合体のうち、主要な構成因子である HIRA を shRNA の導入によってノックダウンした HIRA ノックダウン細胞を作製した (図 3-3A)。HIRA はヒストン H3.3 をクロマチンに導入することで転写活性化に寄与することが知られており、HIRA のノックダウンによって細胞の重要な特性が変化する可能性が懸念されたため、マイクロアレイを用いて HIRA ノックダウン細胞における遺伝子発現を網羅的に解析した。マイクロアレイのデータ解析には、著者が所属した研究室の小櫻裕司氏の協力を得た。コントロール細胞と HIRA ノックダウン細胞との間の各遺伝子の発現量変化を解析したところ、大部分の遺伝子については発現量に大きな違いは見られなかった (図 3-3B)。HIRA ノックダウン細胞で発現量が 2 倍以上に亢進している遺伝子が 9 個、発現量が 0.5 倍以下に低下している遺伝子が 3 個 (HIRA 自体を除く) みられたが、いずれも変化の程度は大きくなく、かつ特定の細胞構成要素や機能に特徴づけられる因子が濃縮されてはいなかった。(図 3-3C)。このことから、通常の培養条件下では、細胞の機能に対する HIRA ノックダウンによる顕著な影響はみられないことが示唆された。

ただし、HIRA ノックダウン細胞は、継代培養を続けると細胞の増殖速度がわずかに遅くなることが観察された。継代培養による培養ストレスが HIRA ノックダウン細胞に対して何らかの選択圧をかけ、ある特定の性質をもった細胞群が細胞集団内で優位に増殖することを防ぐために、必要な時にのみ HIRA をノックダウンできる誘導型 HIRA ノックダウン細胞を作製した。これには、ドキシサイクリン処理によって shRNA が発現する Tet-on システムを利用した。作製された誘導型 HIRA ノックダウン WI-38-hTERT 細胞では、ドキシサイクリンを培養培地に添加した 3 日目以降で、HIRA が効率的にノックダウンされることを確認した (図 3-3D)。

ヒト細胞で見られた獲得耐性にヒストンシャペロン HIRA が寄与しているかどうかを検証するため、熱ストレスによる獲得耐性実験系における HIRA ノックダウン細胞の生存率を測定した。その結果、プライミングストレス単独処理や致死ストレス単独処理による細胞生存率は、コントロール細胞と HIRA ノックダウン細胞で大きな違いは見られなかった。しかし、致死ストレス単独に比べて、プライミングストレス処理後に致死ストレス処理を行う条件によって、コントロール細胞では生存率の有意な増加がみられた一方で、HIRA ノックダウン細胞では、その効果が消失することが確認された (図 3-4)。これらの結果は、HIRA がヒト細胞における獲得耐性に必須であることを示している。

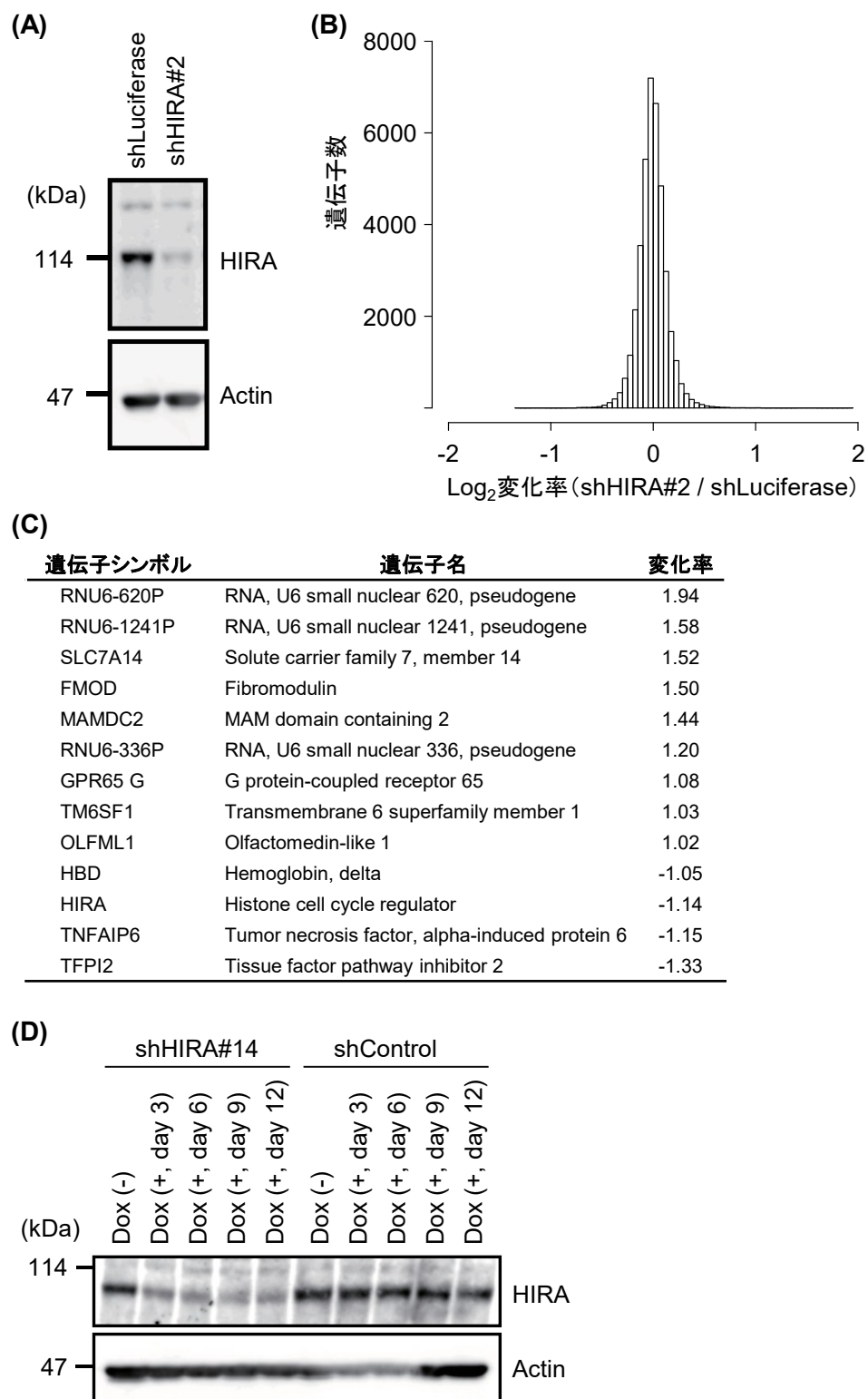


図 3-3 HIRA ノックダウン細胞を作製し、表現型を確認した

(A) レンチウイルス感染によって shHIRA または shLuciferase を遺伝子導入した WI-38-hTERT 細胞

について、ウェスタンブロッティング法により HIRA タンパク質の発現量を確認した。shHIRA#2 によって HIRA をノックダウンした細胞において、HIRA の発現量の減少が確認された。Actin は、ローディングコントロールとして使用した。

(B) HIRA ノックダウン細胞とコントロール細胞における遺伝子発現の差異をヒストグラムで示す。HIRA ノックダウン細胞及びコントロール細胞の遺伝子発現をマイクロアレイによって網羅的に解析し、各遺伝子の発現量の変化率(HIRA ノックダウン細胞／コントロール細胞)を算出した (n=1)。ヒストグラムの横軸は発現量の変化率の $\log_2$ 値を、縦軸は各ビンに含まれる遺伝子の数を示す。

(C) 変化率の $\log_2$ 値が 1 以上あるいは-1 以下であった遺伝子のリストを示す。変化率の $\log_2$ 値が 1 以上(つまり、HIRA ノックダウン細胞で発現量が 2 倍以上に増加)を示した遺伝子は 9 個あった。変化率の $\log_2$ 値が-1 以下(つまり、HIRA ノックダウン細胞で発現量が 1/2 以下に減少)を示した遺伝子は HIRA 自体以外では 3 個あった。

(D) レンチウイルス感染によってドキシサイクリン誘導型 shHIRA または shControl を遺伝子導入した WI-38-hTERT 細胞について、ウェスタンブロッティング法により HIRA タンパク質の発現量を確認した。誘導型 HIRA ノックダウン細胞では、ドキシサイクリン(Dox)を培養培地に添加した3日目以降でHIRA の発現量の減少が確認された。Actin は、ローディングコントロールとして使用した。

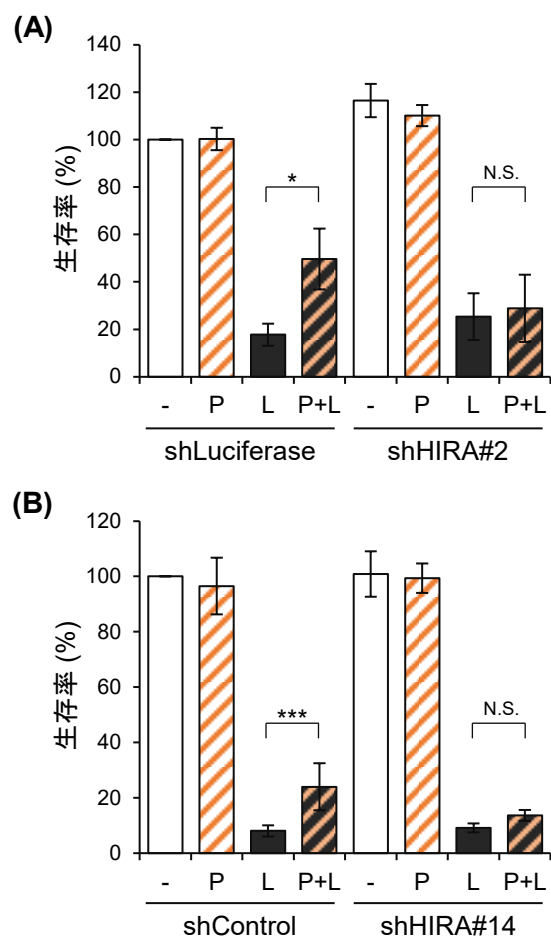


図 3-4 HIRA ノックダウン細胞では獲得耐性が消失する

HIRA ノックダウン細胞を用いた獲得耐性実験の結果を示す。shHIRA#2 または shLuciferase を遺伝子導入した WI-38-hTERT 細胞 (A)、あるいは、ドキシサイクリン誘導型 shHIRA#14 または shControl を遺伝子導入し、ドキシサイクリンを 6 日間添加した WI-38-hTERT 細胞 (B) に、40°C、2 時間のプライミングストレスを与え、引き続き 47°C、35 分間の致死ストレスを与えた。ストレス処理条件は、各細胞について無処理(-)、プライミングストレス単独(P)、致死ストレス単独(L)及びプライミングストレス+致死ストレス(P+L)の 4 通りを実施した。致死ストレス処理から 48 時間後に Cell Counting Kit-8 を用いた WST 法により細胞の生存率を測定した。生存率は、コントロール細胞における無処理サンプルに対する相対値として示す。データは独立した実験から得られた平均値±標準偏差を示す (A: n=3、B: n=7)。統計解析は両側独立 t 検定を用いた(*, $p < 0.05$ 、***, $p < 0.005$ 、N.S.: not significant)。

3-3 低容量ストレス応答による遺伝子発現変動の解析

3-3-1 熱ストレス時におけるストレス応答性因子の遺伝子発現解析

獲得耐性の分子機構を検討するため、以下にあげる既知の代表的なストレス応答性遺伝子について、プライミングストレス単独 (P)、致死ストレス単独 (L) 及びプライミングストレス+致死ストレス (P+L) をそれぞれ処理した直後の発現量を定量 RT-PCR 法により定量した。その結果、熱ストレスに対する応答で働くことが知られている熱ショックタンパク質 *HSP40* (heat shock protein 40) や *HSP70* (heat shock protein 70) は、P 処理時に発現量の増加がみられた (図 3-5A)。また、興味深いことに、L 処理時に比べて P+L 処理時により大きな発現量の増加がみられた。プライミングストレスは、細胞の生存率には影響を及ぼさないが (図 3-1B)、P 処理時及び P+L 処理時に *HSP40* や *HSP70* の遺伝子発現を誘導することが示された。

一方、酸化ストレスへの応答に関与する因子である *CAT* (catalase)、*HO-1* (heme oxygenase-1)、*SOD1* (superoxide dismutase 1)、*SOD2* (superoxide dismutase 2)、*GSR* (glutathione-disulfide reductase)、*GSTM* (glutathione S-transferase mu 1)、*NQO1* (NAD(P)H quinone dehydrogenase 1) 及び *TXN* (thioredoxin) の発現量は、いずれのストレス処理条件においても大きく変化しないことが確認された。(図 3-5B)。熱ストレス処理によってこれらの因子の発現量が増加しなかったことは、少なくとも今回の処理条件での熱ストレスが、酸化ストレス応答機構を活性化しないことを示唆している。これらの結果は、3-1-2 項において熱ストレスによるプライミングストレスでは、致死的な酸化ストレスに対する耐性が獲得されなかった要因の 1 つである可能性が考えられる。

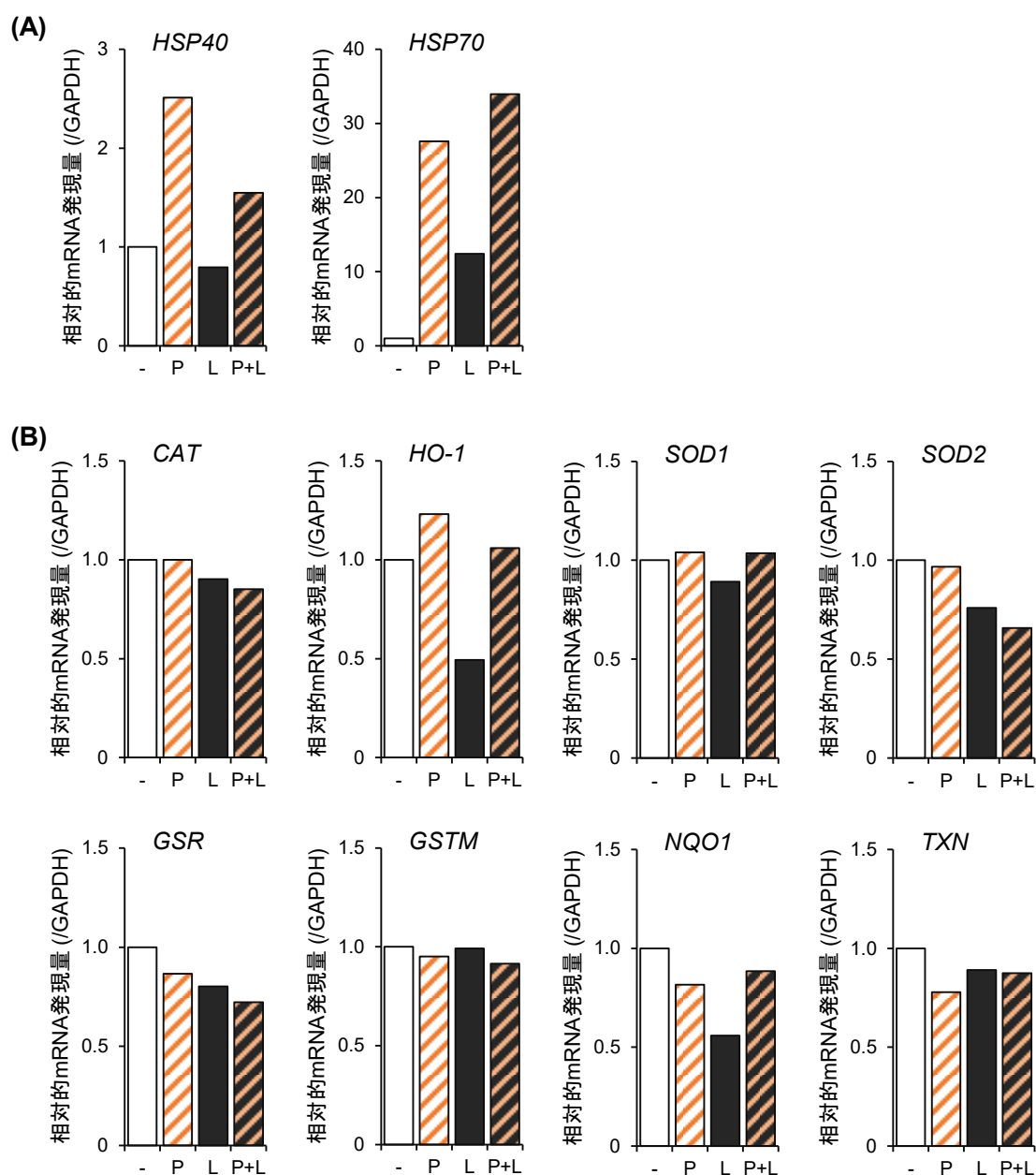


図 3-5 低容量熱ストレス処理によって *HSP40* 及び *HSP70* の発現が誘導される

(A, B) 無処理(-)、プライミングストレス単独(P)、致死性ストレス単独(L)あるいはプライミングストレスと致死性ストレス(P+L)を与えた WI-38-hTERT 細胞について、熱ショックタンパク質 (A) あるいは、酸化ストレスに対するストレス応答性因子 (B) の発現量を定量 RT-PCR 法によって測定した (各 n=1)。各遺伝子の発現量は、ハウスキーピング遺伝子である *GAPDH* の発現量で正規化し、無処理サンプルの発現量に対する相対値として示す。CAT: catalase、HO-1: heme oxygenase-1、SOD1: superoxide dismutase 1、SOD2: superoxide dismutase 2、GSR: glutathione-disulfide reductase、GSTM: glutathione S-transferase mu 1、NQO1: NAD(P)H quinone dehydrogenase 1、TXN: thioredoxin。

プライミングストレス時に *HSP70* や *HSP40* のように発現量が増加する因子を網羅的に同定するため、プライミングストレス処理後の細胞を用いて RNA シーケンス解析を実施した。次世代シーケンサーによるシーケンス及びシーケンスデータの解析は、白髭克彦教授及び中戸隆一郎准教授（東京大学）との共同研究にて実施した。また、サンプルの調製は、著者が所属した研究室の麓裕希子氏の協力を得て実施した。

プライミングストレス処理直後の細胞と無処理の細胞それぞれでの全遺伝子の発現量を算出し、その平均値（横軸）と変化率（縦軸）を MA プロットで示す（図 3-6A）。統計解析の結果から、プライミングストレス処理をした細胞において発現量が有意に増加もしくは減少した遺伝子を赤いドットで示す。発現量が有意に増加した遺伝子の中で、*HSPA1A*、*HSPA1B*、*HSPA5*、*HSPA6*、*HSPA4L* 及び *HSPH1*（それぞれ、HSP70 members 1A、1B、5、6、4 Like 及び HSP110）、*DDIT3* (DNA damage inducible transcript 3、別名 *GADD153* もしくは *CHOP*、ER ストレス応答に関連する転写因子)、*HERPUD1* (homocysteine inducible ER protein with ubiquitin-like domain 1、ER ストレス応答に関与する因子)、並びに *DNAJB1* (DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B1) が、特に高い変化率を示した。発現量が有意に増加した遺伝子は 455 個同定され、それらの因子が関与する生物学的プロセスを GO (Gene Ontology) 解析によって調べたところ、FDR (false discovery rate) < 0.05 の有意差をもって濃縮されたプロセスが 8 個あり、そのうちの 3 個は unfolded protein response (UPR) 関連のプロセスであった（図 3-6B）。UPR は、熱ストレスによって引き起こされる反応として知られていることから、今回の熱ストレスを用いたプライミングストレス後の反応として理にかなっており、上述した熱ショックタンパク質ファミリーや ER ストレス応答に関連する因子が濃縮されていた。また、その他のプロセスとしては、DNA を鋳型とした転写反応、熱に対する応答、タンパク質のユビキチン化制御といったプロセスが濃縮された。一方、プライミングストレス処理によって発現量が減少する遺伝子は 379 個同定された。これらの因子が関与する生物学的プロセスを GO 解析によって調べたところ、5 個のプロセスが FDR < 0.05 の有意差をもって濃縮されたが、際だって低い FDR 値をもつプロセスはなく、また類似したプロセスが重複してみられることもなかった（図 3-6C）。

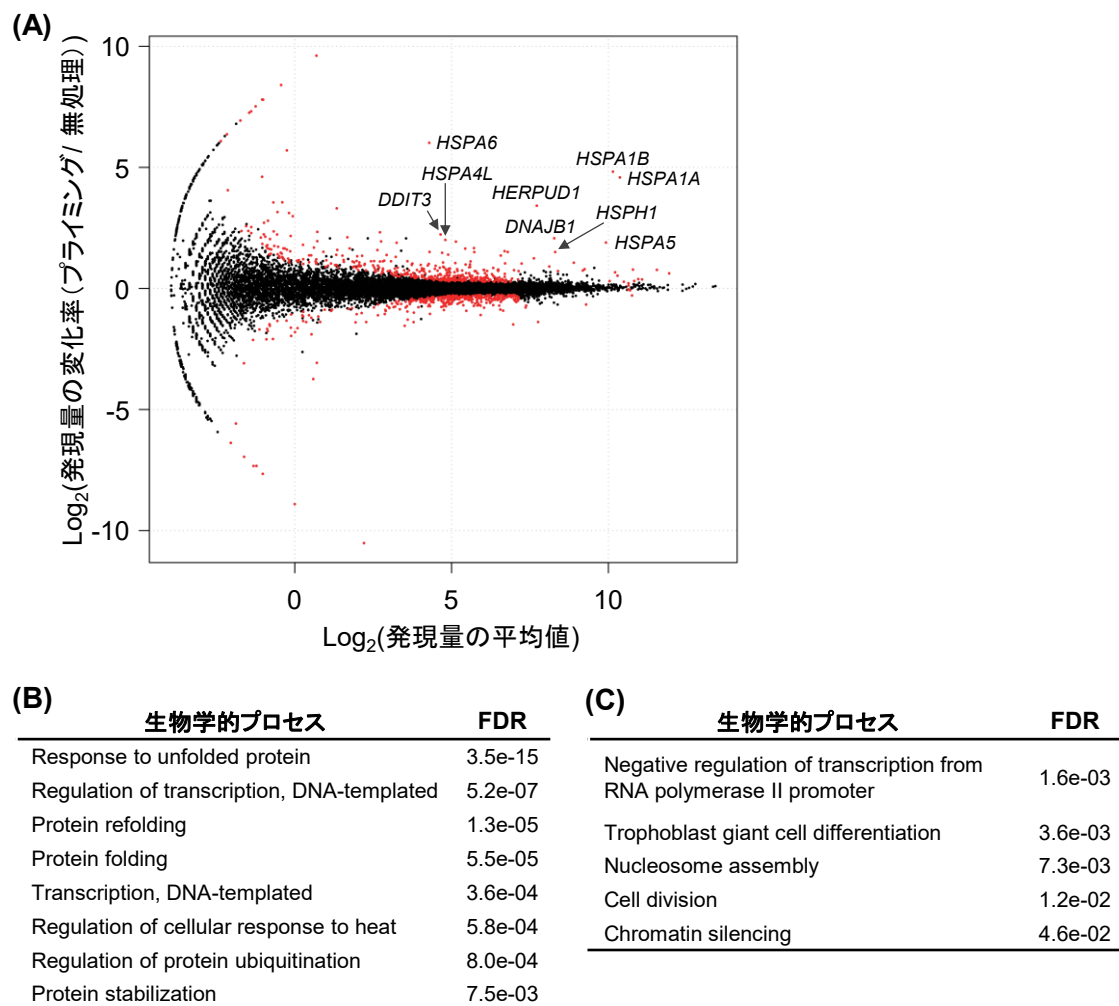


図 3-6 低容量熱ストレス処理後には unfolded protein response が活性化される

(A) プライミングストレス処理直後の細胞と無処理の細胞から全 RNA を回収し、RNA シーケンス解析により遺伝子発現変動を網羅的に解析した (n=2)。各遺伝子の発現量について、横軸にプライミング処理サンプルと無処理サンプルでの発現量の平均値の $\log_2$ 値を、縦軸に発現量の変化率(プライミング処理サンプル/無処理サンプル)の $\log_2$ 値をプロットした MA プロットを示す。各遺伝子の発現量は、RNA シーケンス時の CPM (counts per million mapped reads) 値を使用した。赤いプロットは、プライミング処理サンプルで有意に発現量が増加あるいは低下した遺伝子を示す。プライミング処理サンプルで高発現がみられた代表的な因子の遺伝子名を図中に示す。

HSPA1A: Hsp70 member 1A、HSPA1B: Hsp70 member 1B、HSPA5: Hsp70 member 5、HSPA6 : Hsp70 member 6、HSPA4L: Hsp70 member 4 like、HSPH1: Hsp110、DDIT3: DNA damage inducible transcript 3、HERPUD1: homocysteine inducible ER protein with ubiquitin-like domain 1、DNAJB1: DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B1。

(B, C) プライミング処理サンプルで発現量が有意に増加した遺伝子群 (B)、あるいは有意に低下した遺伝子群 (C) について、GO 解析を行い、有意(FDR < 0.05)に濃縮された生物学的プロセスを示す。

3-3-2 低容量ストレス応答における熱ショックタンパク質の遺伝子発現

上述の RNA シーケンス解析の結果のうち、プライミングストレスによって発現量が顕著に増加した *HSPA1A*、*DNAJB1*、*HSPA4L* 及び *HSPA5* に着目した。プライミングストレス処理前及び処理直後の細胞から RNA を抽出し、これらの因子の発現量の変化を定量 RT-PCR によって調べた (図 3-7A)。その結果、RNA シーケンスの結果と一致して、ストレス処理後の発現量の増加が確認された (図 3-7B-E、図中の Control 細胞)。予想に反して、獲得耐性の消失がみられた HIRA ノックダウン細胞において同様にプライミングストレス後の各遺伝子の発現量を調べたところ、プライミングストレスによって誘導されるこれら因子の発現増加には影響がみられなかった (図 3-7B-E、図中の HIRA ノックダウン細胞)。これらの結果から、プライミングストレス直後のストレス応答性遺伝子の転写には、HIRA は必須ではないことが示唆された。

3-3-3 獲得耐性における熱ショックタンパク質の遺伝子発現

次に、プライミングストレス後に発現が増加する *HSPA1A*、*DNAJB1*、*HSPA4L* 及び *HSPA5* 遺伝子と獲得耐性との関連を調べるため、致死ストレス単独 (L) あるいはプライミングストレス+致死ストレス (P+L) を処理した細胞について、処理前、処理直後及び4時間の回復期間後におけるこれらの因子の発現量を定量 RT-PCR によって調べた (図 3-8A)。P+L 処理直後の各遺伝子の発現量は、L 処理直後と比較して、有意な増加がみられた (図 3-8B-E、図中の回復 (-))。この傾向は、コントロール細胞だけでなく、HIRA ノックダウン細胞においても観察された。4 時間の回復期間後の発現量をみると、コントロール細胞では、P+L 処理では L 処理と比較して 2 倍近い発現量の増加がみられた (図 3-8B-E、図中のコントロール細胞、回復 (+))。一方、HIRA ノックダウン細胞における *HSPA1A* 及び *DNAJB1* の発現量は、P+L 処理時と L 処理の間に差はみられなかった (図 3-8B, C、図中の回復 (+))。HIRA ノックダウン細胞における *HSPA4L* 及び *HSPA5* の発現量は、P+L 処理によって L 処理よりも増加がみられたが (それぞれ $p = 0.0032$ 、 $p = 0.0072$)、その有意差はそのコントロール細胞の P+L 処理時と L 処理でみられた有意差 (それぞれ $p = 0.0017$ 、 $p = 0.00016$) よりは小さかった (図 3-8D, E、図中の回復 (+))。

これらの観察結果は、先行する低容量のストレスが、ヒストンシャペロン HIRA を介してストレス応答性遺伝子の転写が誘導されやすいクロマチン状態を形成し、そのあとの致死ストレス後のストレス応答性遺伝子の発現上昇を増強し、維持することを示唆している。

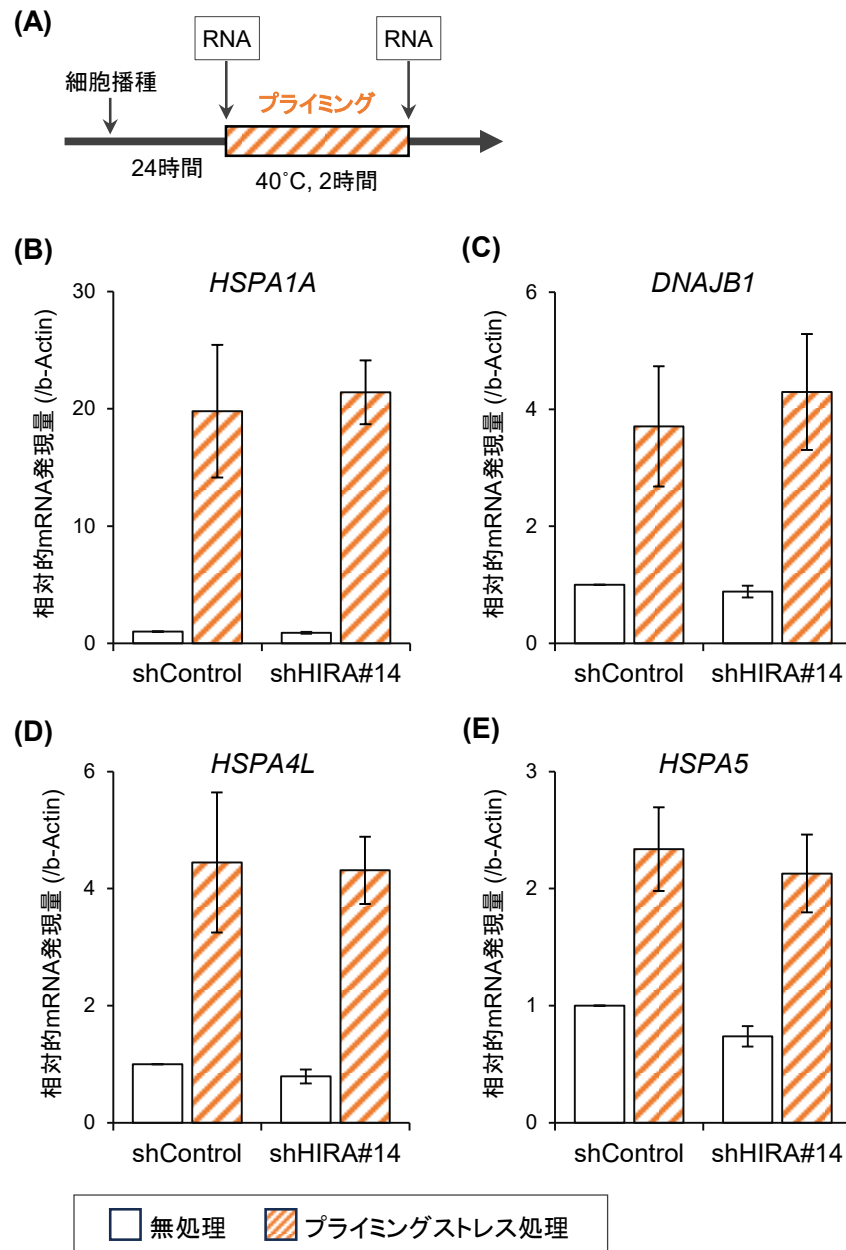


図 3-7 低容量熱ストレス負荷直後の HSP 遺伝子群の発現増加応答には、HIRA は必須ではない

(A) プライミングストレス処理前後の遺伝子発現解析のタイムコースを示す。HIRA ノックダウン細胞及びコントロール細胞を播種してから 24 時間後に 40°C、2 時間のプライミングストレスを与え、その直後に全 RNA を回収し、定量 RT-PCR によって HSP 遺伝子群の発現量を測定した。

(B-E) HIRA ノックダウン細胞及びコントロール細胞における *HSPA1A* (B)、*DNAJB1* (C)、*HSPA4L* (D) 及び *HSPA5* (E) の発現量の定量結果を示す。各遺伝子の発現量は、 β -Actin の発現量で正規化し、コントロール細胞の無処理サンプルの発現量に対する相対値として示す。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。HIRA ノックダウン細胞及びコントロール細胞は、ドキシサイクリン添加から 6 日目の細胞を使用した。

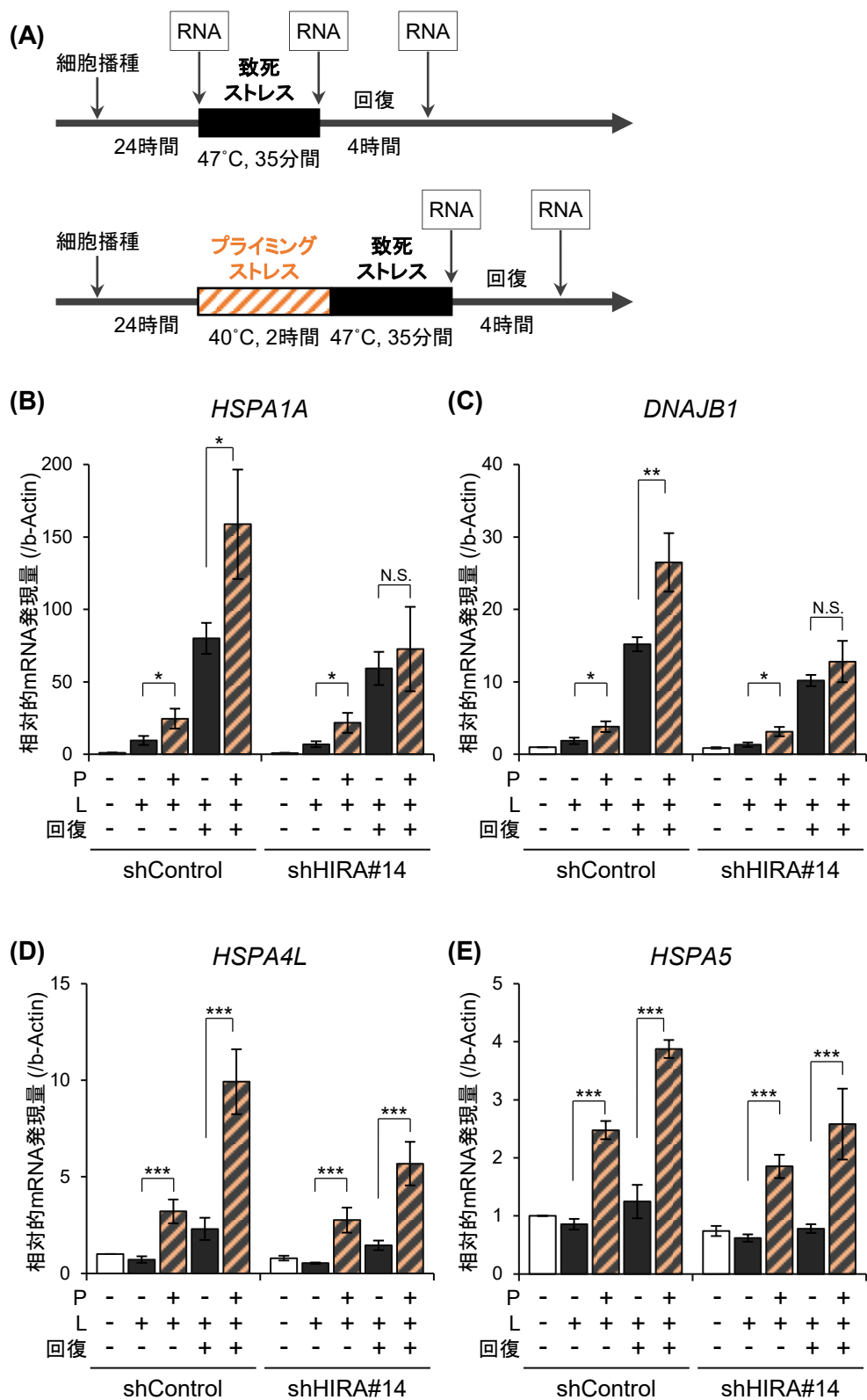


図 3-8 獲得耐性条件では HIRA 依存的に HSP 遺伝子群の高発現が誘導された

(A) ストレス処理後の遺伝子発現解析のタイムコースを示す。HIRA ノックダウン細胞及びコントロール細胞を播種してから 24 時間後に、47°C、35 分間の致死ストレス(L)、または 40°C、2 時間のプライミ

ングストレス後に致死ストレス(P+L)を与え、それぞれ処理直後あるいは 37°C で 4 時間の回復期間後に全 RNA を回収し、定量 RT-PCR によって HSP 遺伝子群の発現量を測定した。

(B-E) HIRA ノックダウン細胞及びコントロール細胞における *HSPA1A* (B)、*DNAJB1* (C)、*HSPA4L* (D) 及び *HSPA5* (E) の発現量の定量結果を示す。各遺伝子の発現量は、 β -Actin の発現量で正規化し、コントロール細胞の無処理サンプルの発現量に対する相対値として示す。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。HIRA ノックダウン細胞及びコントロール細胞は、ドキシサイクリン添加から 6 日目の細胞を使用した。統計解析は両側独立 t 検定を用いた(*, $p < 0.05$ 、**, $p < 0.01$ 、***, $p < 0.005$ 、N.S.: not significant)。

3-4 獲得耐性における HIRA の作用機構の解析

3-4-1 クロマチン免疫沈降に使用する抗 HIRA 抗体の作製

低容量のストレスが HIRA を介してストレス応答性遺伝子の持続的な発現誘導をもたらす作用機構を検討するためには、HIRA がヒストン H3.3 特異的なヒストンシャペロンとしての機能を有することを考慮し、HIRA による遺伝子発現のエピジェネティックな制御を調べる必要があると考えた。そのためには、クロマチン免疫沈降法によって HIRA のクロマチン上での局在を検証することが有効である。クロマチン免疫沈降実験には、対象タンパク質を効率よく免疫沈降することができる抗体が必要であるから、HIRA を免疫沈降するのに適した抗 HIRA 抗体を自作することを試みた。

まず、抗原とする HIRA のリコンビナントタンパク質を準備した。HIRA タンパク質は全長が 1,017 アミノ酸と比較的大きく、3 つの機能ドメインを有する (図 3-9A)。N 末端側にある WD リピートドメインは、 β プロペラ構造を形成し、HIRA 複合体の構成因子である UBN1 をはじめとしたタンパク質との相互作用に寄与する (Tang et al. 2006)。中央にある HIRAB ドメインは、 β シート構造を形成し、ヒストンシャペロン ASF1a との相互作用に寄与する (Tang et al. 2006)。C 末端側にある HIRA C ドメインは、2 つの WD モチーフを有し、HIRA 複合体の構成因子である CABIN1 との相互作用に必要である (Rai et al. 2011)。N 末端側の 300 アミノ酸または HIRA B ドメインを含む 306 アミノ酸から成るリコンビナント HIRA 断片を作製し、それぞれ HIRA(N) 抗原、HIRA(B) 抗原とした (図 3-9A)。各抗原を 2 羽のウサギの皮下にそれぞれ注射することで免疫した後、各ウサギの血清を回収し、硫酸沈殿法によってタンパク質を濃縮し、透析することで抗 HIRA 抗体を得た。抗原の種類とウサギの個体番号から N1、N2、B1 及び B2 抗体と名付けた (図 3-9B)。

WI-38-hTERT 細胞あるいはヒト胎児腎臓由来不死化細胞株 293FT 細胞 (293 細胞の増殖が速い派生株) から調製した細胞抽出液と 4 種類の抗 HIRA 抗体をそれぞれ反応させ、自作抗体が HIRA タンパク質を免疫沈降できるかを検証した。抗体の陽性対照として用いた市販の抗 HIRA マウスモノクローナル抗体 WC15 は、293FT 細胞抽出液中の

HIRA を免疫沈降することが確認された (図 3-9C)。WI-38-hTERT 細胞抽出液では免疫沈降が確認できなかったが、これは細胞抽出液のタンパク質濃度が低かったためだと考えられる。自作抗体の中では、HIRA(B1) 抗体が WC15 抗体以上の効率で HIRA を免疫沈降することを確認した。また、HIRA(B2) 抗体及び HIRA(N1) 抗体も、効率は少し劣るが、HIRA を免疫沈降することが確認された。

作製した抗体の純度を高めるために、HIRA(B1) 抗体及び HIRA(B2) 抗体について、アフィニティー精製を行い、溶出時のフラクションを分けることで、HIRA(B1#1~8) 抗体及び HIRA(B2#1~9) 抗体をそれぞれ得た (図 3-9B)。アフィニティー精製後の抗体と WI-38-hTERT 細胞抽出液を反応させたところ、HIRA(B2#6) 抗体が最も効率よく HIRA を免疫沈降することが確認された (図 3-9D, E)。そこで、抗 HIRA 抗体 B2#6 を以降の実験に使用した。

3-4-2 クロマチン免疫沈降シーケンスによる HIRA の局在の網羅的な解析

低容量ストレスを受けた細胞における HIRA の機能を調べるため、プライミングストレス直後に採取した細胞と無処理の細胞を用いて、クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) 法により、ゲノムワイドな HIRA の局在を調べた。次世代シーケンサーによるシーケンス及びシーケンスデータの解析は、白髭克彦教授及び中戸隆一郎准教授 (東京大学) との共同研究にて実施した。また、ChIP-seq データの詳細な解析は、著者が所属した研究室の小櫻裕司氏の協力を得て実施した。

3-4-1 項で作製した抗 HIRA 抗体 B2#6 で沈降させた HIRA タンパク質と共沈降したゲノム DNA 断片を次世代シーケンサーによってシーケンスし、ヒトリファレンスゲノムにアラインメントされたシーケンスリードを解析することで、HIRA が結合するゲノム領域を同定した。HIRA の結合部位として、プライミングストレス処理細胞では 29,022 個、無処理細胞では 19,285 個のピークが検出された (図 3-10A)。プライミングストレス処理の有無による HIRA の結合領域の変化を調べるため、プライミングストレス処理細胞と無処理細胞で検出された結合領域の重なりを解析した。HIRA の結合領域は、ゲノム上で平均約 500 bp の広がりをもっており、プライミングストレス処理細胞と無処理細胞において、結合領域が 1 bp 以上重なる場合を、重複する結合領域として識別した。その結果、プライミングストレス処理細胞の HIRA 結合領域のうち、58% (29,022 個中 16,886 個) は無処理細胞のものと重複する一方で、42% (29,022 個中 12,136 個) はプライミングストレス処理細胞でのみ見られた (図 3-10A)。また、無処理細胞の HIRA 結合領域は、90% (19,285 個中 17,363 個) がプライミングストレス処理細胞と重複しており、無処理時に固有の結合領域は残りの 10% (19,285 個中 1,922 個) にとどまった。これらの結果から、HIRA はプライミングストレス後に、ストレス処理前に結合していた領域に加えて、*de novo* の結合部位を獲得すると考えられる。

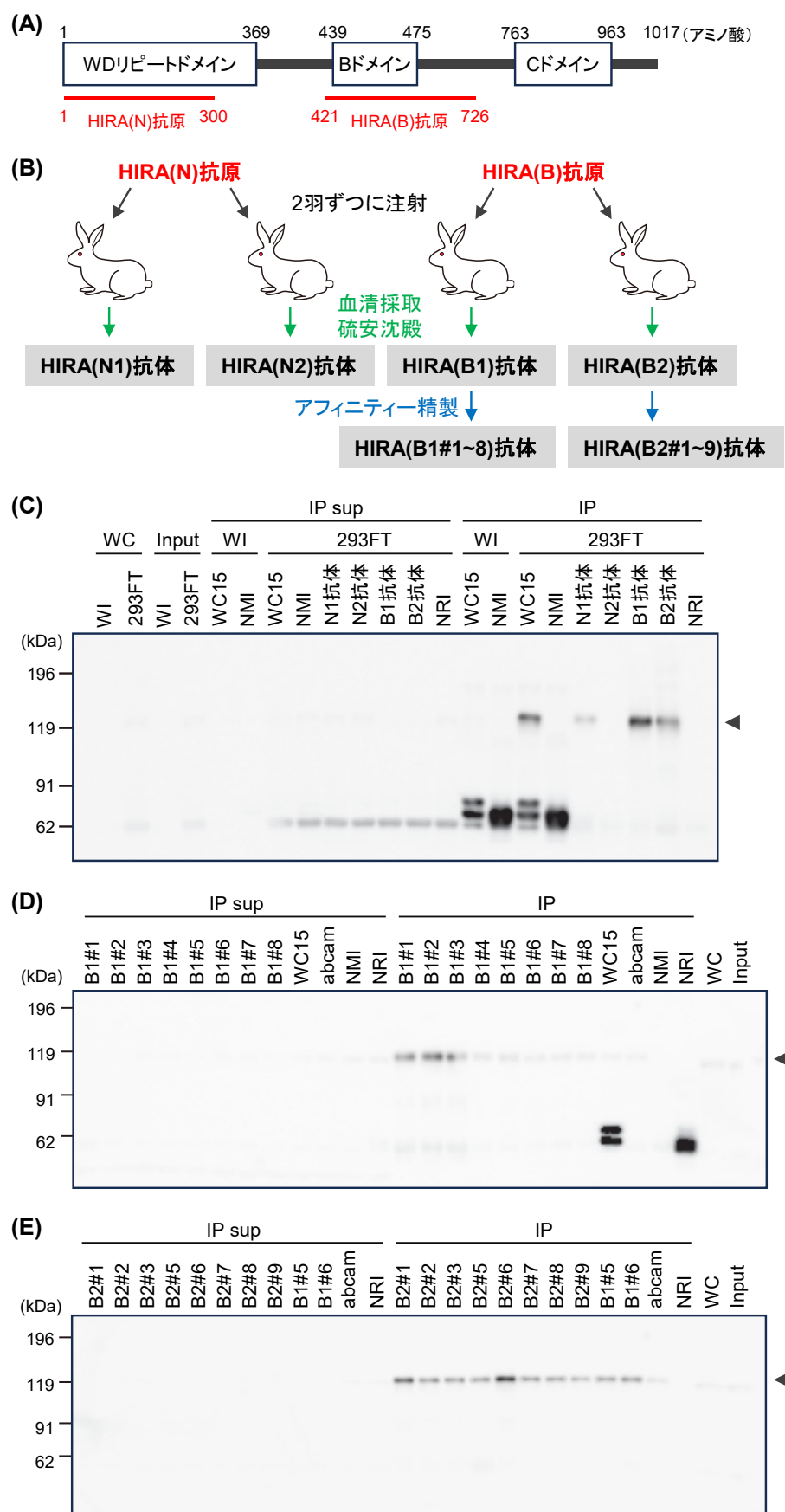


図 3-9 HIRA に対するウサギポリクローナル抗体の作製

(A) ヒト HIRA タンパク質のドメイン構造とアミノ酸長を示す。ウサギに抗体を作製させるための抗原として、N 末端から 300 アミノ酸の領域を HIRA(N) 抗原とした。また、Bドメインを含む 306 アミノ酸から成る領域を HIRA(B) 抗原とした。

(B) HIRA タンパク質断片を抗原として抗 HIRA ウサギポリクローナル抗体を作製する手順を示す。HIRA (N) 抗原または HIRA (B) 抗原をそれぞれ 2 羽のウサギに免疫し、血清を回収した。硫酸沈殿法によって血清からタンパク質を濃縮し、透析することで HIRA(N1) 抗体、HIRA(N2) 抗体、HIRA(B1) 抗体及び HIRA(B2) 抗体を得た。さらに、HIRA(B1) 抗体及び HIRA(B2) 抗体をアフィニティー精製し、溶出時に分画することで、それぞれ HIRA(B1#1~8) 抗体及び HIRA(B2#1~9)抗体を得た(#は分画の番号を示す)。

(C) WI-38-hTERT 細胞(WI)または 293FT 細胞から調製した全細胞抽出液に対して HIRA(N1) 抗体、HIRA(N2) 抗体、HIRA(B1) 抗体、HIRA(B2) 抗体または市販の抗 HIRA マウスモノクローナル抗体(WC15)を反応させ、HIRA を免疫沈降した。抗体に対する陰性対照として正常ウサギ IgG (normal rabbit IgG: NRI) 及び正常マウス IgG (normal mouse IgG: NMI) を使用した。全細胞溶解液(WC)、免疫沈降用抽出液(Input)、免疫沈降後サンプル(IP)及び免疫沈降後の上清サンプル (IP sup) に含まれる HIRA タンパク質を、ウェスタンブロッティング法により検出した。ウェスタンブロッティングには市販の抗 HIRA 抗体(Active Motif, 39557)を使用した。図中の矢尻は、HIRA タンパク質の想定されるバンド位置(112 kDa 付近)を示す。62 kDa 付近のバンドの由来は不明。

(D) WI-38-hTERT 細胞から調製した全細胞抽出液に対して、作製した HIRA(B1#1~8)抗体または市販の抗 HIRA 抗体(WC15 及び abcam)を反応させ、HIRA を免疫沈降した。抗体に対する陰性対照として NMI 及び NRI を使用した。全細胞溶解液(WC)、免疫沈降用抽出液(Input)、免疫沈降後のサンプル(IP)及び免疫沈降後の上清サンプル (IP sup) に含まれる HIRA タンパク質を、ウェスタンブロッティング法により検出した。

(E) WI-38-hTERT 細胞から調製した全細胞抽出液に対して、作製した HIRA(B2#1~9)抗体(#4 抗体を除く)または市販の抗 HIRA 抗体(abcam)を反応させ、HIRA を免疫沈降した。抗体に対する陰性対照として NRI を使用した。全細胞溶解液(WC)、免疫沈降用抽出液(Input)、免疫沈降後のサンプル (IP)及び免疫沈降後の上清サンプル (IP sup) に含まれる HIRA タンパク質を、ウェスタンブロッティング法により検出した。

プライミングストレス処理細胞と無処理細胞で見られた HIRA 結合領域の数は異なったが、ゲノム上における位置的特徴は類似していた。どちらの場合も、HIRA 結合領域の約 3 分の 2 は遺伝子領域 (5'非翻訳領域 (5' UTR、転写開始点から開始コドンの 1 つ手前の塩基まで) と 3'非翻訳領域 (3' UTR、終始コドンの 1 つ後の塩基から転写終結点まで) を含む) に位置し、残りの 3 分の 1 は遺伝子間領域に位置していた (図 3-10B)。HIRA による遺伝子発現制御機構を検討するうえでの洞察を得るために、遺伝子領域内での分布に注目した。タンパク質をコードする各遺伝子上でみられた HIRA の結合領域を抽出し、さらに、ゲノム上での遺伝子領域の長さが遺伝子ごとに異なることを考慮し、各遺伝子の全長を 100 とした場合の相対的な分布位置を算出した。そのように全遺伝子について正規化した分布パターンを平均化することで、ゲノム上の遺伝子領域における HIRA の平均分布図を作成した (図 3-10C)。その結果、プライミングストレス処理後及び無処理の両方の検体で、HIRA は特に転写開始点近傍に局在することがわかり、これは、HIRA が転写開始点に分布するという過去の知見と一致する (Pchelintsev et al. 2013)。全遺伝子の平均でみた際には、転写開始点付近以外には HIRA が顕著に局在する領域は見られなかった。プライミングストレス処理細胞と無処理細胞では、分布パターンに大きな違いは見られなかったものの、転写開始点近傍における HIRA の局在は、プライミングストレス処理細胞において強くなる傾向がみられた。

また、HIRA はヒストン H3.3 をクロマチン中に動員するヒストンシャペロンであることから、ヒストン H3.3 の分布についても解析を行った。市販のヒストン H3.3 特異的抗体を用いて ChIP-seq を行い、HIRA のピーク位置に対するヒストン H3.3 のピーク位置を検証した (図 3-10D)。その結果、プライミングストレス処理後及び無処理の両方において、予想通りヒストン H3.3 が HIRA 結合領域付近に濃縮されることがわかった。ただし、遺伝子のプロモーター領域では、RNA ポリメラーゼによる転写の進行を物理的に円滑にするためにヌクレオソームが取り除かれるため、HIRA のピーク頂点である転写開始点近傍ではヒストン H3.3 の結合量は減少していた。

これらのデータから、HIRA がヒストンシャペロンとして機能し、低容量ストレス条件下でも非ストレス条件と同様に、主に遺伝子の転写開始点の近傍にヒストン H3.3 を導入することが示された。

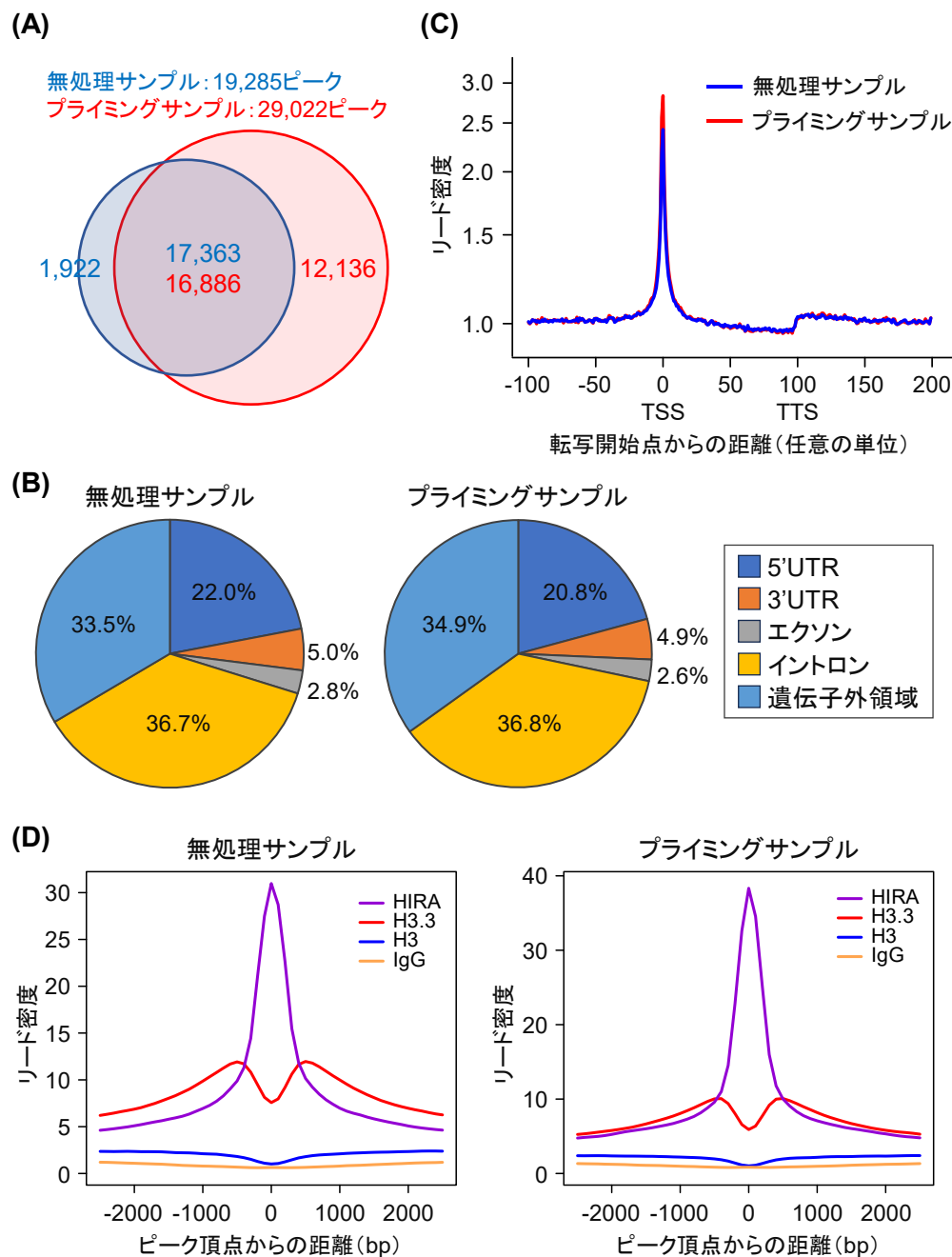


図 3-10 HIRA は遺伝子の転写開始点に局在する

(A) 無処理の細胞及びプライミングストレス処理直後の細胞において、HIRA のゲノム上の局在を ChIP-seq 法により網羅的に解析した (n=1)。各サンプルで得られたピークの数と、ピークの重なり度合いをベン図で示す。共通部分のピーク数が異なる理由は、各サンプルのピークが一对一対応ではないためである。

(B) 無処理サンプル(左)及びプライミング処理サンプル(右)における HIRA のクロマチン上での結合位置を、3'UTR、5'UTR、エクソン、イントロンまたは遺伝子外領域に分類し、その割合を円グラフで示す。

(C) 無処理サンプル及びプライミングサンプル処理において、遺伝子領域の近傍でみられた HIRA の局在パターンを示す。横軸は、転写開始点 (transcription start site: TSS) を 0、転写終結点 (transcription termination site: TTS) を 100 として全遺伝子の全長を正規化し、HIRA の局在位置を転写開始点からの距離で表す。縦軸は、HIRA のピークに含まれるリードの密度を $\log_2$ スケールで表す。

(D) 無処理サンプル(左)及びプライミング処理サンプル(右)について、HIRA の結合位置の近傍で見られるヒストン H3.3 及びヒストン H3 の分布を示す (各 $n=1$)。横軸は、HIRA の ChIP-seq でみられたピークの頂点から 2,500 bp 以内の範囲を表す。縦軸は、HIRA、ヒストン H3.3、ヒストン H3 及び陰性対照 IgG の ChIP-seq のリードの密度を表す。

3-4-3 熱ショックタンパク質遺伝子座における HIRA とヒストン H3.3 の局在

HIRA の ChIP-seq 解析から、プライミングストレス処理後に HIRA が著しく増加する遺伝子座の 1 つは、熱ショックタンパク質 HSP70 をコードする *HSPA1A* 遺伝子であった (図 3-11A)。さらに、3-3-3 項で検証したとおり、HSP70 の発現は、HIRA を介した獲得耐性時の応答に関与することから、*HSPA1A* 遺伝子座における HIRA の局在をより詳細に検証した。

ChIP-qPCR 法によって、プライミングストレス処理細胞及び無処理細胞における HIRA の局在を調べたところ、*HSPA1A* 遺伝子座の転写開始点、オープンリーディングフレーム及び転写終結点において、ストレス処理後に HIRA の局在量の増加がみられた (図 3-11B, C)。また、3-3-3 項で *HSPA1A* と同様に獲得耐性への関与が示唆された *HSPA5* の遺伝子座についても HIRA の局在を調べたところ、*HSPA1A* 遺伝子座の結果と同じように、プライミング処理後に転写開始点、オープンリーディングフレーム及び転写終結点での有意な増加がみられた (図 3-11B, D)。対照的に、*GAPDH* 遺伝子座ではプライミングストレス処理による HIRA の局在量の有意な変化は観察されなかった (図 3-11B, E)。

次に、プライミングストレス後の *HSPA1A* 遺伝子座及び *HSPA5* 遺伝子座におけるクロマチンダイナミクスを詳細に分析した。HIRA の局在と一致して、プライミングストレス後にヒストン H3.3 も *HSPA1A* 遺伝子座の転写開始点及びオープンリーディングフレームでの局在が観察された (図 3-12A)。*HSPA5* 遺伝子座の転写開始点においても、統計学的に有意ではないものの、プライミングストレス後に局在量の増加傾向がみられた。ヒストン H3.3 のクロマチンへの導入は、転写活性化に関連するヒストン翻訳後修飾と高い相関関係にあることが知られている。そこで、転写活性化のヒストン翻訳後修飾であるヒストン H3 の 4 番目のリジンのトリメチル化 (H3K4me3) 並びにヒストン H3 の 9 番目、14 番目及び 27 番目のリジンのアセチル化 (それぞれ H3K9ac、H3K14ac、H3K27ac) の量を ChIP-qPCR 法によって検証した。H3K4me3 は、プライミングストレ

ス後に *HSPA1A* 遺伝子座の転写開始点、オープンリーディングフレーム及び転写終結点、並びに *HSPA5* 遺伝子座のオープンリーディングフレームで有意な増加がみられた (図 3-12B)。H3K4me3 の増加がみられた領域では、対照的に、同じく転写活性化のマーカであるヒストン H3 の 4 番目のリジンのモノメチル化 (H3K4me) の減少が確認された (図 3-12C)。また、H3K9ac、H3K14ac 及び H3K27ac は、プライミングストレス後に *HSPA1A* 遺伝子座の転写開始点及びオープンリーディングフレーム、並びに *HSPA5* 遺伝子座のオープンリーディングフレームで増加がみられた (図 3-12D, E, F)。

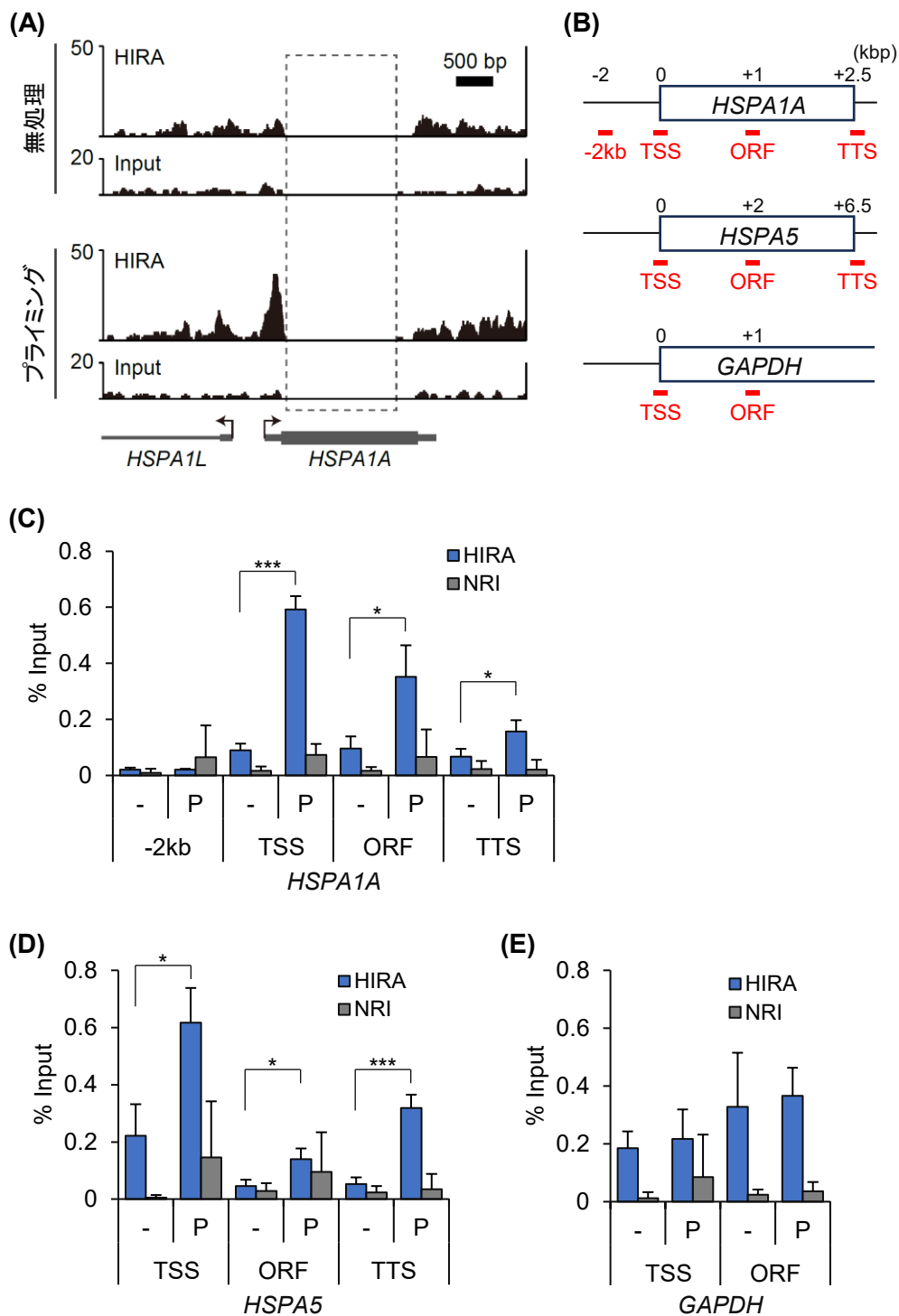


図 3-11 低容量熱ストレス応答時に *HSP* 遺伝子座での HIRA の結合が増加する

(A) 無処理の細胞及びプライミングストレス処理をした細胞の *HSPA1A* 遺伝子座近傍における、HIRA の ChIP-seq のピークを示す。縦軸は、各ゲノム領域でのリード数である CPM (counts per million mapped reads) 値、横軸はゲノム領域を示す。ChIP-seq のピークを検出する際に、ゲノム上の複数の領域にマッピングされるリードを排除した(2-9 項参照)。そのため、*HSPA1A* 遺伝子と *HSPA1B* 遺

伝子の配列相同性が高いことから、破線で囲まれた領域にはリードがマッピングされず、ピークが検出されなかった。

(B) *HSPA1A* 遺伝子座、*HSP5A* 遺伝子座及び *GAPDH* 遺伝子座における PCR プライマーの設計位置を示す。「-2」は転写開始点 (TSS) の約 2 kbp 上流、「TSS」は転写開始点付近、「ORF」はオープンリーディングフレーム内、「TTS」は転写終結点付近を含む領域を表す。数字は、転写開始点からの距離 (単位は kbp) を表す。

(C-E) 無処理の細胞 (図中の「-」) 及びプライミングストレス処理をした細胞 (図中の「P」) の *HSPA1A* 遺伝子座 (C)、*HSP5A* 遺伝子座 (D) 及び *GAPDH* 遺伝子座 (E) における HIRA の結合量を ChIP-qPCR によって定量した。縦軸は、input サンプルに対して濃縮された割合を示す。正常ウサギ IgG (normal rabbit IgG: NRI) は、抗体に対する陰性対照として使用した。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。統計解析は両側独立 t 検定を用いた (*, $p < 0.05$ 、***, $p < 0.005$)。

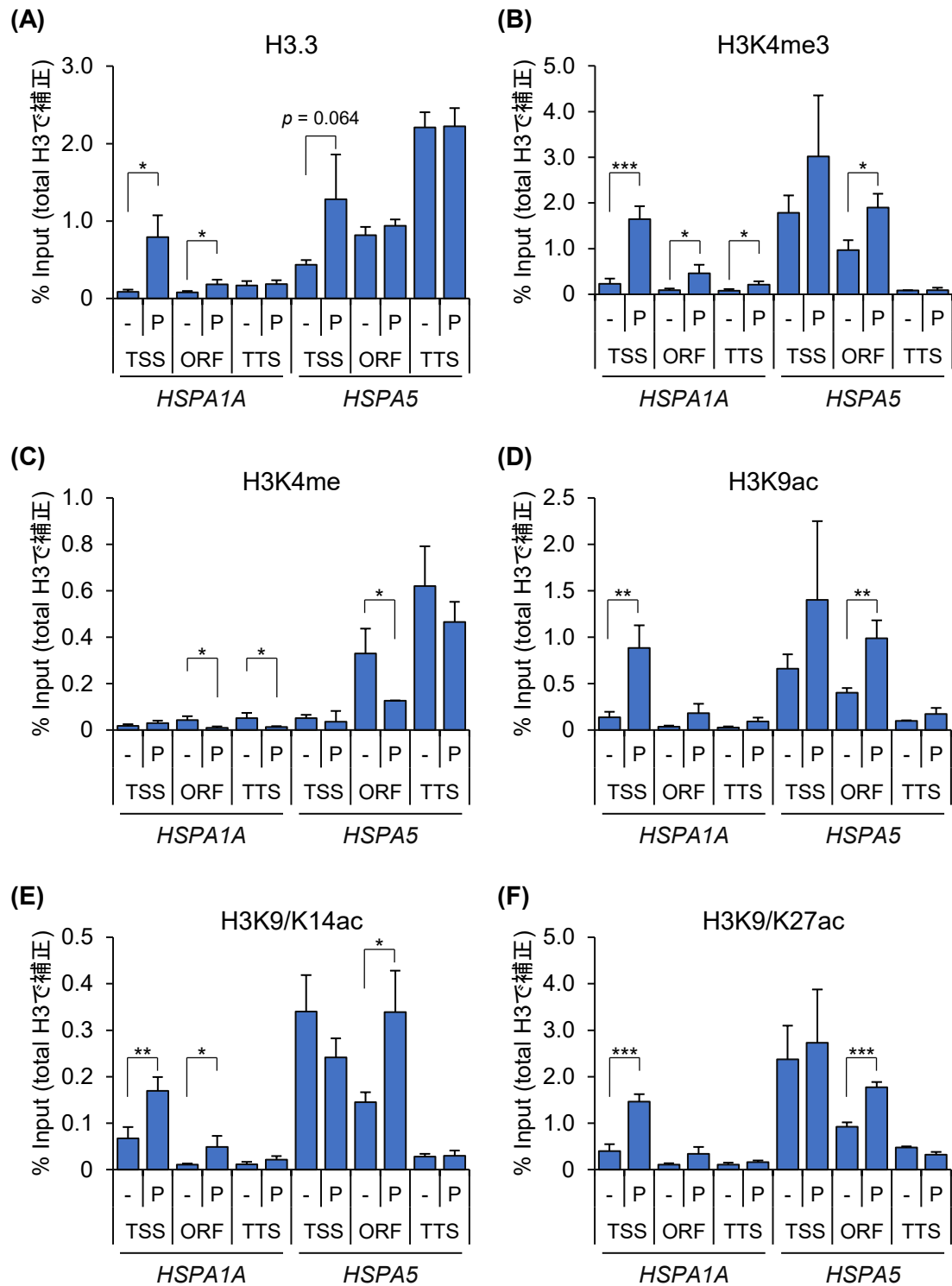


図 3-12 低容量熱ストレス応答時にヒストン H3.3 及び転写活性型ヒストン翻訳後修飾が *HSP* 遺伝子座で増加する

(A-F) 無処理の細胞(図中の「-」)及びプライミングストレス処理をした細胞(図中の「P」)の *HSPA1A* 遺伝子座及び *HSPA5* 遺伝子座におけるヒストン H3.3 (A)、H3K4me3 (B)、H3K4me (C)、H3K9ac

(D)、H3K9/K14ac (E) 及び H3K9/K27ac (F) の結合量を ChIP-qPCR によって定量した。縦軸は、input サンプルに対して濃縮された割合について、ヌクレオソーム量を考慮するために total ヒストン H3 のデータで正規化して示す。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値±標準偏差を示す。統計解析は両側独立 t 検定を用いた(*, $p < 0.05$ 、**, $p < 0.01$ 、***, $p < 0.005$)。

これらの遺伝子座において、プライミングストレス後に HIRA 及びヒストン H3.3 によって、クロマチンが転写活性化状態になっていることが示されたため、転写反応を担う RNA ポリメラーゼや、その働きを促進する転写制御因子もリクルートされているかを検証した。その結果、RNA ポリメラーゼ II 及びエンハンサーからの情報を RNA ポリメラーゼ II へと伝達する転写コファクターであるメディエーター複合体の構成要素である Med1 (Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1) も、プライミングストレス後に *HSPA1A* 遺伝子座での増加がみられた (図 3-13)。

これらの結果より、低容量ストレスによって *HSPA1A* や *HSPA5* の遺伝子座に HIRA 及びヒストン H3.3 がリクルートされ、それに付随して転写活性化のヒストン修飾が増加し、転写が活性化されることが示唆された。重要なことに、3-3-2 及び 3-3-3 項で検証したように、*HSPA1A* や *HSPA5* の遺伝子発現量は、低容量ストレスそのものの直後には HIRA ノックダウン細胞においても維持される一方で、獲得耐性条件時には HIRA ノックダウン細胞において減弱する。このことから、低容量ストレス時に起こる *HSPA1A* や *HSPA5* の遺伝子座における HIRA 及びヒストン H3.3 やヒストン修飾の増加は、瞬間的な遺伝子発現の増加よりは、その後の適応的なストレス応答に寄与しているように考えられる。ヒストン H3.3 がクロマチンに導入されると、遺伝子を活性状態に維持し、エピジェネティックメモリーとして機能するという報告があることから (Kamada et al. 2018; Ng and Gurdon 2008)、細胞が低容量ストレスを受けた際に、ストレス応答性遺伝子を活性化させることがエピジェネティックメモリーとして刻み込まれることで、将来起こりうるストレスに備える可能性が考えられる。

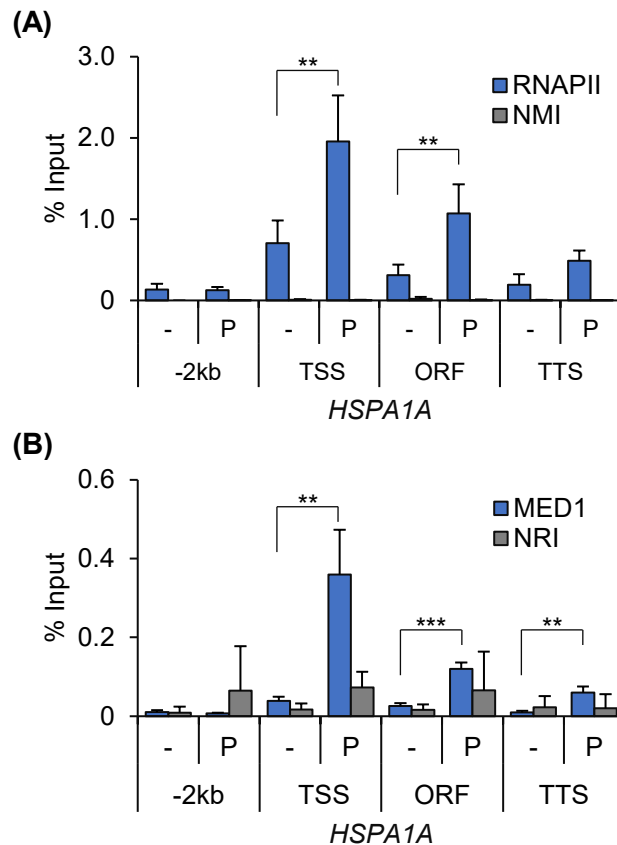


図 3-13 低容量熱ストレス応答時に *HSPA1A* 遺伝子座での RNA ポリメラーゼ II 及びメディエーターの結合が増加する

(A, B) 無処理の細胞(図中の「-」)及びプライミングストレス処理をした細胞(図中の「P」)の *HSPA1A* 遺伝子座における RNA ポリメラーゼ II (A) 及びメディエーター構成タンパク質 MED1 (B) の結合量を ChIP-qPCR によって定量した。縦軸は、input サンプルに対して濃縮された割合を示す。正常マウス IgG (normal mouse IgG: NMI) 及び正常ウサギ IgG (normal rabbit IgG: NRI) は、抗体に対する陰性対照として使用した。データは独立した実験から得られた平均値±標準偏差を示す(A: n=4、B: n=3)。統計解析は両側独立 t 検定を用いた(**, $p < 0.01$ 、***, $p < 0.005$)。

3-5 獲得耐性の持続性の検証

3-5-1 HIRA やヒストン H3.3 の *HSPA1A* 遺伝子座への局在の持続時間

3-3-3 項では、P+L 処理によってストレス応答性遺伝子の発現が回復期間においても維持、増強されることが観察された(図 3-8B-E)。そこで、遺伝子発現の持続がもたらされる機構を分子レベルで理解するために、3-4-3 項で観察された、プライミングストレス後のストレス応答性遺伝子における HIRA やヒストン H3.3、ヒストン翻訳後修飾の局在が持続するかどうかを検証した。プライミングストレス処理前、並びに処理後 0、

2、4 及び 8 時間経過した時点の細胞を回収し、*HSPA1A* 遺伝子座における各因子の結合量をクロマチン免疫沈降法によって測定した (図 3-14A)。その結果、HIRA 及び RNA ポリメラーゼ II の *HSPA1A* 遺伝子座における局在は、プライミングストレス処理直後には有意に観察されたが、処理後 2 時間では処理前と同程度の量まで低下した (図 3-14B, C)。このことから、RNA ポリメラーゼ II は低容量ストレス直後に一過的に転写反応を行い、すぐに *HSPA1A* 遺伝子座から離れたと推察される。一方、ヒストン H3.3 や H3K9ac の *HSPA1A* 遺伝子座での局在量は、統計学的な有意差は認められなかったものの、プライミングストレス処理後 8 時間にわたって、ストレス処理前よりも高い水準で維持される傾向がみられた (図 3-14D, E)。つまり、ヒストン H3.3 及び／あるいはその翻訳後修飾は、一過的に増加するのではなく、一定期間そのクロマチン領域をマーキングするために局在し続けることが示唆された。

これらの結果から、HIRA を介した低容量ストレスに対する適応的なストレス応答は、低容量ストレス直後に一過的にリクルートされる RNA ポリメラーゼ II ではなく、ヒストン H3.3 やヒストン修飾によって維持される可能性が示唆された。

3-5-2 獲得耐性効果の持続時間

プライミングストレス後に *HSPA1A* 遺伝子座で起こるエピジェネティックな修飾が数時間の間維持されることから、プライミングストレスによる獲得耐性の表現型も、プライミングストレスから一定期間が経過した後まで維持されるのかを検証した。そのために、獲得耐性実験系のプライミングストレス処理と致死ストレス処理の間に 37°C での回復期間を設け、その回復期間の時間を変化させることで、獲得耐性表現型の持続時間を調べた (図 3-15A)。その結果、これまでの実験と同じく 2 時間のプライミングストレスで処理した細胞は、プライミングストレス後 2 時間にわたって獲得耐性による生存率の有意な増加を示すことがわかった (図 3-15B)。獲得耐性の効果は、時間の経過にともなって減弱する傾向がみられ、プライミングストレス後 4 時間以降では、生存率の有意な増加を観察することはできなかった。

細胞を取り巻く微小環境の変化は、瞬間的な場合もあるだろうが、長時間にわたって起こる場合もあると考えられる。そこで、より長時間のプライミングストレスにさらされたときに、細胞の適応応答は増強されるのかを検討した。(実験は、著者が所属した研究室の麓裕希子氏が行った。) これまでの獲得耐性実験と同様の手順を行うなかで、プライミングストレス処理の時間を 24 時間に延長したところ、細胞は顕著に強い獲得耐性を示した (図 3-15C、図中の「回復 0 時間」)。さらに、24 時間のプライミングストレス処理の後、回復期間を設けて獲得耐性表現型の持続時間を調べたところ、6 時間までは獲得耐性による生存率の有意な増加を示した (図 3-15C)。24 時間のプライミングストレスによる獲得耐性は、2 時間のプライミングストレスによる獲得耐性よりも持続

時間が長かった。このことは、細胞が長時間の刺激にさらされた場合には、獲得耐性の機構がより長期間維持されることを示唆する。

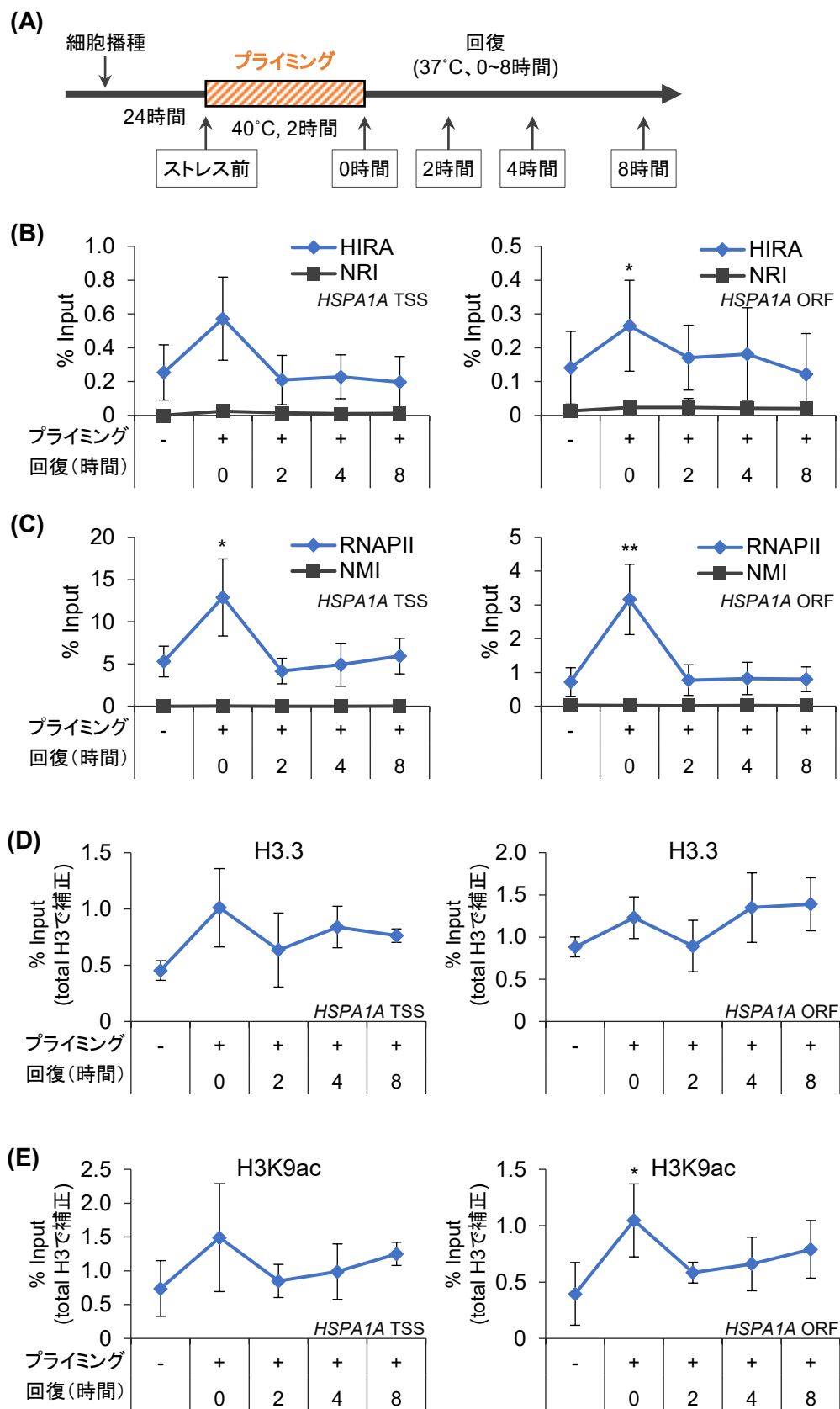


図 3-14 低容量熱ストレス応答後に HSPA1A 遺伝子座に導入されたヒストン H3.3 及び H3K9ac は維持される傾向がある

(A) プライミングストレス処理をした細胞から ChIP 用サンプルを調製するタイムコースを示す。細胞を播種してから 24 時間後(図中の「ストレス前」)及び 40°C、2 時間のプライミングストレスを与え、その直後、あるいは 37°C で 2, 4 及び 8 時間の回復期間後に ChIP 用サンプルを回収した。

(B-E) 各サンプル回収時点における HSPA1A 遺伝子座の TSS 領域(左)及び ORF 領域(右)におけるヒストン HIRA (B)、RNA ポリメラーゼ II (C)、ヒストン H3.3 (D) 及び H3K9ac (E) の結合量を ChIP-qPCR によって定量した。縦軸は、input サンプルに対して濃縮された割合を示し、ヒストン H3.3 及び H3K9ac のデータは、ヌクレオソーム量を考慮するために total ヒストン H3 のデータによって正規化して示す。正常マウス IgG (normal mouse IgG: NMI) 及び正常ウサギ IgG (normal rabbit IgG: NRI) は、抗体に対する陰性対照として使用した。データは独立した実験から得られた平均値±標準偏差を示す(B, C: n=4、D, E: n=3)。統計解析は両側独立 t 検定を用いた(*, $p < 0.05$ 、**, $p < 0.01$)。

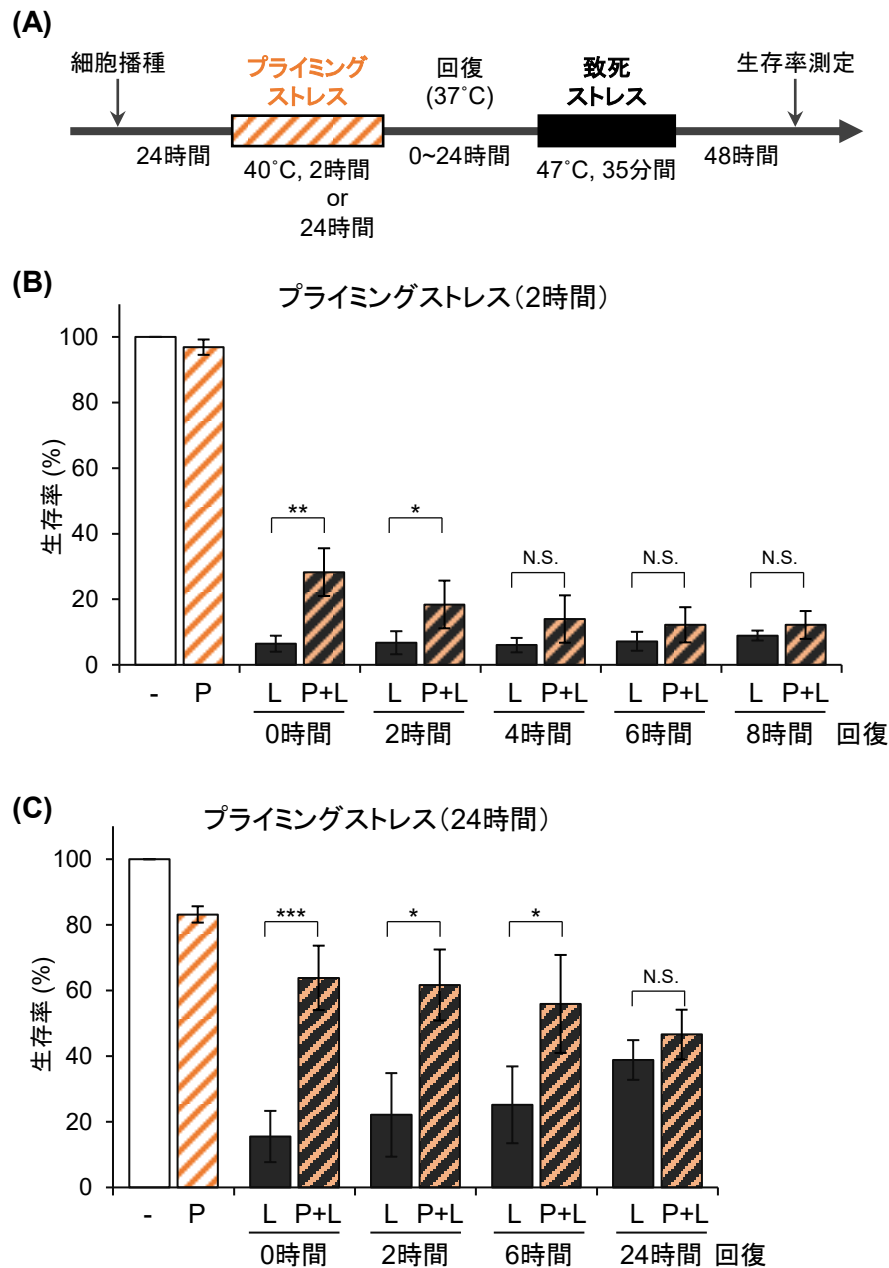


図 3-15 長時間の低容量熱ストレスは獲得耐性を持続させる

(A) プライミングストレス後に回復期間を設けた獲得耐性の実験系のタイムコースを示す。細胞を播種してから 24 時間後に 40°C で 2 時間あるいは 24 時間のプライミングストレス(P)を与え、37°C で 0~24 時間の回復期間を設けた後に 47°C、35 分間の致死ストレス(L)を与えた。致死ストレス処理から 48 時間後に Cell Counting Kit-8 を用いた WST 法により細胞の生存率を測定した。

(B) 2 時間のプライミングストレスを与え、37°C で 0~8 時間の回復期間を設けたときの生存率の結果を示す。

(C) 24 時間プライミングストレスを与え、37°C で 0~24 時間の回復期間を設けたときの生存率の結果を示す。

生存率は、無処理サンプルに対する相対値として示す。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値±標準偏差を示す。統計解析は両側独立 t 検定を用いた(*, $p < 0.05$ 、**, $p < 0.01$ 、***, $p < 0.005$ 、N.S.: not significant)。

3-6 獲得耐性時に HIRA と協調的に機能する因子の探索

3-6-1 HSP70 及び HSF1 の検討

3-4-2 項で検証したとおり、HIRA は遺伝子の転写開始点近傍に集積する。HIRA 複合体自身の DNA 結合能に配列特異性はないため (Ray-Gallet et al. 2011; Ricketts et al. 2019)、低容量ストレス応答時に HIRA をストレス応答性遺伝子の転写開始点にリクルートする因子が HIRA と協調的に機能していると考えられる。遺伝子の転写開始点へ作用する因子の候補としては転写因子が考えられたため、獲得耐性に寄与している転写因子が存在するという仮説を立て、いくつかの候補となる転写因子について、その寄与の有無を検討した。

3-4-3 項では、プライミングストレス応答時に HIRA 及びヒストン H3.3 が局在する遺伝子領域として、熱ショックタンパク質 HSP70 をコードする *HSPA1A* に着目した。HSP70 の転写因子としては、HSF1 が知られている。そこで、HSP70 または HSF1 を siRNA によってノックダウンし、各ノックダウン細胞で獲得耐性が起こるかどうかを検証した。HSP70 と HSF1 それぞれに対する siRNA を処理することで、各因子が非常に効率よくノックダウンされた細胞を得た (図 3-16A, B)。siRNA に関する陰性対照として siLuciferase を処理したコントロール細胞に 40°C で 2 時間のプライミングストレス (P) 及び 47°C で 35 分間の致死ストレス (L) を与えたところ、L 単独処理に比べて、P+L 処理では生存率の有意な増加がみられた (図 3-16C、図中の「siLuciferase」)。一方、HSP70 ノックダウン細胞及び HSF1 ノックダウン細胞では、P+L 処理条件において一定程度の獲得耐性効果が観察されたものの、その効果はコントロール細胞に比べると弱く、L 単独処理と P+L 処理との間に有意差はみられなかった (図 3-16C)。これらの結果から、HSP70 と HSF1 は、獲得耐性の付与に一定程度の寄与があることが示された。HSP70 のノックダウンによって獲得耐性が完全には消失しなかった理由としては、熱ショックタンパク質は HSP70 以外にも HSP40、HSP60、HSP90 及び HSP110 など複数のファミリーが存在し、それらが獲得耐性に寄与する可能性が考えられる。また、HSF1 のノックダウンによる獲得耐性の消失が部分的であった理由についても、真核細胞の熱ショック転写因子としては HSF1 が主要な役割を果たすものの、HSF2 (heat shock transcription factor 2) や HSF4 (heat shock transcription factor 4) など複数のアイソフォームが存在し、それらが代償的に機能する可能性が考えられる。

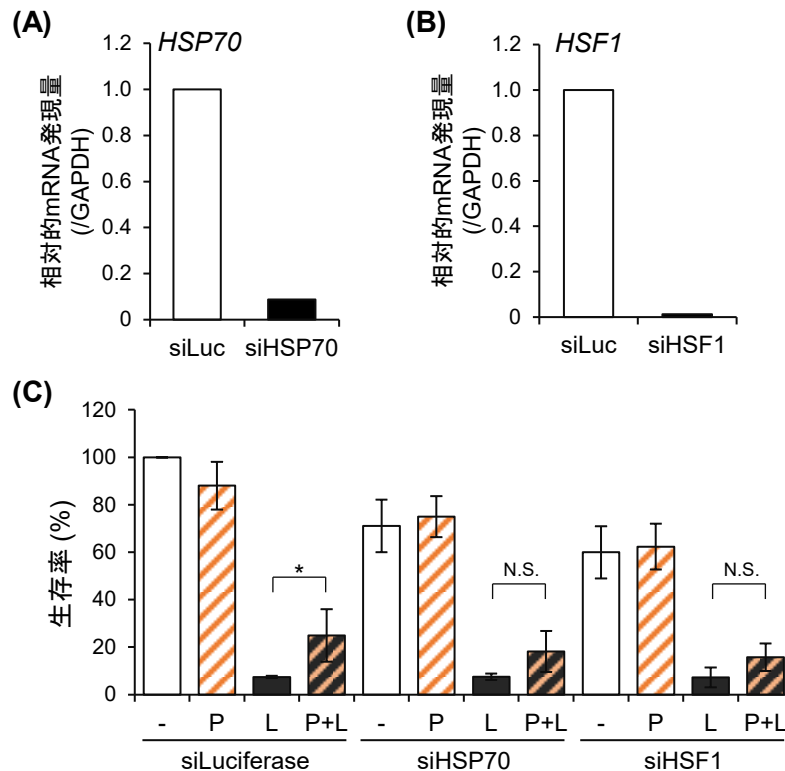


図 3-16 HSP70 及び HSF1 が獲得耐性の形成に関与する

(A, B) siRNA による *HSP70* (A) 及び *HSF1* (B) のノックダウン効率を示す。WI-38-hTERT 細胞を播種すると同時に *HSP70* あるいは *HSF1* に対する siRNA を添加し、24 時間後に全 RNA を回収した。*HSP70* 及び *HSF1* の発現量を RT-PCR によって定量し、ハウスキーピング遺伝子である *GAPDH* の発現量で正規化し、siLuciferase を導入した陰性対照細胞における発現量に対する相対値として示す。

(C) siRNA を処理した細胞における獲得耐性実験の生存率を示す。細胞を播種すると同時に *HSP70* あるいは *HSF1* に対する siRNA を添加し、標的因子をノックダウンした。細胞を播種してから 24 時間後に 40°C、2 時間のプライミングストレス(P)を与え、引き続き 47°C、35 分間の致死ストレス(L)を与えた。致死ストレス処理から 48 時間後に Cell Counting Kit-8 を用いた WST 法により細胞の生存率を測定した。生存率は、siLuciferase を処理した陰性対照細胞の無処理サンプルに対する相対値として示す。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値±標準偏差を示す。統計解析は両側独立 t 検定を用いた(*, $p < 0.05$, N.S.: not significant)。

3-6-2 HIF-1 の検討

プライミングストレス応答時にはたらく可能性のある転写因子について、HSF1 以外の候補を得るため、プライミングストレス処理後に HIRA を介した活性化が予想されるシグナル経路を調べた。そこで、3-4-2 項で実施した HIRA の ChIP-seq データから、HIRA

の結合が確認された遺伝子をリストアップし、パスウェイ解析を実施した。プライミングストレス処理後に特異的な HIRA 結合領域に含まれる遺伝子群に対するパスウェイ解析の結果、翻訳制御、低酸素シグナル、小胞体ストレス応答、ユビキチン化経路といった多岐にわたるストレス応答プロセスが有意に濃縮された(図 3-17A、左図)。一方、無処理の細胞で特異的にみられた HIRA 結合領域に含まれた遺伝子群についてのパスウェイ解析では、 p 値が十分に小さい特徴的なシグナル経路の濃縮はみられなかった(図 3-17A、右図)。これらの結果から、低容量ストレス応答時に HIRA は、複数のストレス応答経路に属する遺伝子群に対して転写活性化に向けたエピジェネティックな変化をもたらし、ストレスに対する防御機能を備える可能性が示唆された。

プライミングストレス処理後に最も小さい p 値 ($p = 4.57E-07$) を示した eIF2 経路については、HIRA が結合した eIF2 経路に関連する遺伝子群のうち半数 (42 個中 21 個) を、リボソームタンパク質をコードする遺伝子群が占めていた。リボソームタンパク質の遺伝子発現を制御する転写因子としては、GATA 転写因子ファミリー、Ets (E26 transformation-specific) ファミリー転写因子である GABP (GA-binding protein)、SP1 (specificity protein 1)、YY1 (Yin Yang 1) などが知られている (Petibon et al. 2021; Yoshihama et al. 2002)。リボソームタンパク質遺伝子の転写は、これら複数の転写因子によって細胞の状況に応じた複雑な制御がなされている。そのため、今回の実験条件から特定の転写因子の候補を絞りこむことが困難であり、eIF2 経路についてはこれ以上の解析は行わなかった。

次に、プライミングストレスを受けた細胞において 2 番目に小さい p 値 ($p = 5.37E-06$) で抽出された低酸素シグナルに着目した。低酸素シグナルに関与する転写因子としては低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor-1: HIF-1) がよく知られている。HIF-1 は、細胞内が低酸素状態に陥った際に活性化される転写因子であり、HIF-1 α と HIF-1 β からなるヘテロ二量体である。この転写因子は低酸素状態に対する応答として、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、エリスロポエチン、グルコース・トランスポーター、各種糖分解酵素などのタンパク質をコードする遺伝子の転写を促進する。HIF-1 が獲得耐性に関与しているかどうかを検証するため、3 種類の HIF-1 阻害剤を使用し、HIF-1 阻害が獲得耐性に及ぼす影響を調べた。Echinomycin は環状ペプチドであり、DNA に対してインターカレーターとして作用し、HIF-1 α の DNA への結合を阻害する。Chrysin は抗酸化作用や抗炎症作用を示すフラボノイドの 1 つで、HIF-1 α の分解を促進することが知られている。Acriflavine は HIF-1 α と HIF-1 β の二量体化を阻害する化合物である。作用機序の異なるこれらの HIF-1 阻害剤をそれぞれ 2 時間処理した細胞に対してプライミングストレスを与え (プライミングストレス処理中も HIF-1 阻害剤を添加)、その後に致死ストレスを与えた (図 3-17B)。その結果、コントロール細胞では獲得耐性効果が観察されたのに対して、いずれの HIF-1 阻害剤も獲得耐性効果を消失させた (図 3-17C, D)。

HIF-1 の獲得耐性への関与をより直接的に検証するため、siRNA を用いて HIF-1 α をノックダウンした (図 3-17E)。2 種類の siRNA を用いて作製したノックダウン細胞に、プライミングストレス及び致死ストレスを与えた結果、期待に反して、いずれのノックダウン細胞でも獲得耐性が観察された (図 3-17F)。HIF-1 を化合物によって薬理的に阻害した場合は獲得耐性効果の消失がみられたが、siRNA を用いた阻害では獲得耐性が維持されるという一見矛盾した現象が観察された。この結果は、HIF-1 の阻害方法によって異なる作用が生じた可能性を示唆している。薬理的阻害では HIF-1 全体の活性が抑制されるのに対し、siRNA ノックダウンでは HIF-1 α の発現量を低下させるものの、HIF-2 α など他の関連因子が補完的に作用した可能性が考えられる。一方、薬理的阻害においては、HIF-1 以外の分子への非特異的な作用が獲得耐性の消失に寄与した可能性も考えられる。例えば、Chrysin は、HIF-1 以外に、ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase: HDAC) やシクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase-2: COX-2) も阻害することが知られている。今回の実験だけでは、HIF-1 が獲得耐性に関与している可能性を十分に立証するには至らなかった。HIF-1 の役割を明確化するためには、より特異的な HIF-1 阻害剤や、HIF-1 α と HIF-2 α の個別の寄与を分離して評価する実験が必要である。

3-6-3 AP-1 の検討

さらに別の転写因子の候補を同定するため、HIRA の ChIP-seq データを用いたシーケンスモチーフ解析 (材料と方法 2-10-3 項を参照) により、HIRA 結合領域の DNA 配列に特定の配列パターンが濃縮されているかを検討した。データ解析は、著者が所属した研究室の小櫻裕司氏の協力を得て実施した。その結果、転写因子 AP-1 (activator protein-1) の結合モチーフが HIRA 結合領域に有意に存在することを見出した (図 3-18A)。AP-1 は、c-Fos、c-Jun、ATF 及び JDP ファミリーに属するタンパク質から構成されるヘテロ二量体転写因子であり、成長因子やサイトカイン、ウイルス感染といったさまざまな刺激によって活性化され、ストレス応答性遺伝子の発現を制御する。重要なことに、HIRA が AP-1 ヘテロ二量体の構成要素である c-Jun と物理的に相互作用することが報告されている (Pchelintsev et al. 2013)。

そこで、AP-1 の活性化が獲得耐性に関与しているかどうかを検証するため、AP-1 を活性化させると致死ストレスに対して耐性を示すかを検討した。Anisomycin は真核細胞のタンパク質合成を阻害する抗生物質で、MAPK (mitogen-activated protein kinase) ファミリーに属する JNK (c-Jun N-terminal kinase) の活性化を介して AP-1 を活性化する化合物である。Anisomycin をプライミングストレスの代わりに 2 時間処理し、その後に致死ストレスを与えた場合の細胞生存率を調べた (図 3-18B)。その結果、興味深いことに、Anisomycin をプライミングストレス処理の代わりに処理した細胞において、プライミングストレスを処理した細胞で見られる獲得耐性と同様に、生存率の増加が観察された (図 3-18C)。

AP-1 の獲得耐性への関与をより直接的に検証するため、siRNA を用いて AP-1 の構成要素の 1 つである ATF-2 あるいは ATF-4 をノックダウンした細胞を作製した(図 3-18D, E)。ATF-2 ノックダウン細胞並びに ATF-4 ノックダウン細胞に対して、プライミングストレス及び致死ストレスを与えた結果、コントロール細胞で観察された有意な獲得耐性効果が消失した(図 3-18F)。これらの結果から、ATF-2 や ATF-4 から構成される転写因子 AP-1 が、プライミングストレスに対する応答時に機能し、獲得耐性表現型を付与するのに貢献していることが示唆された。

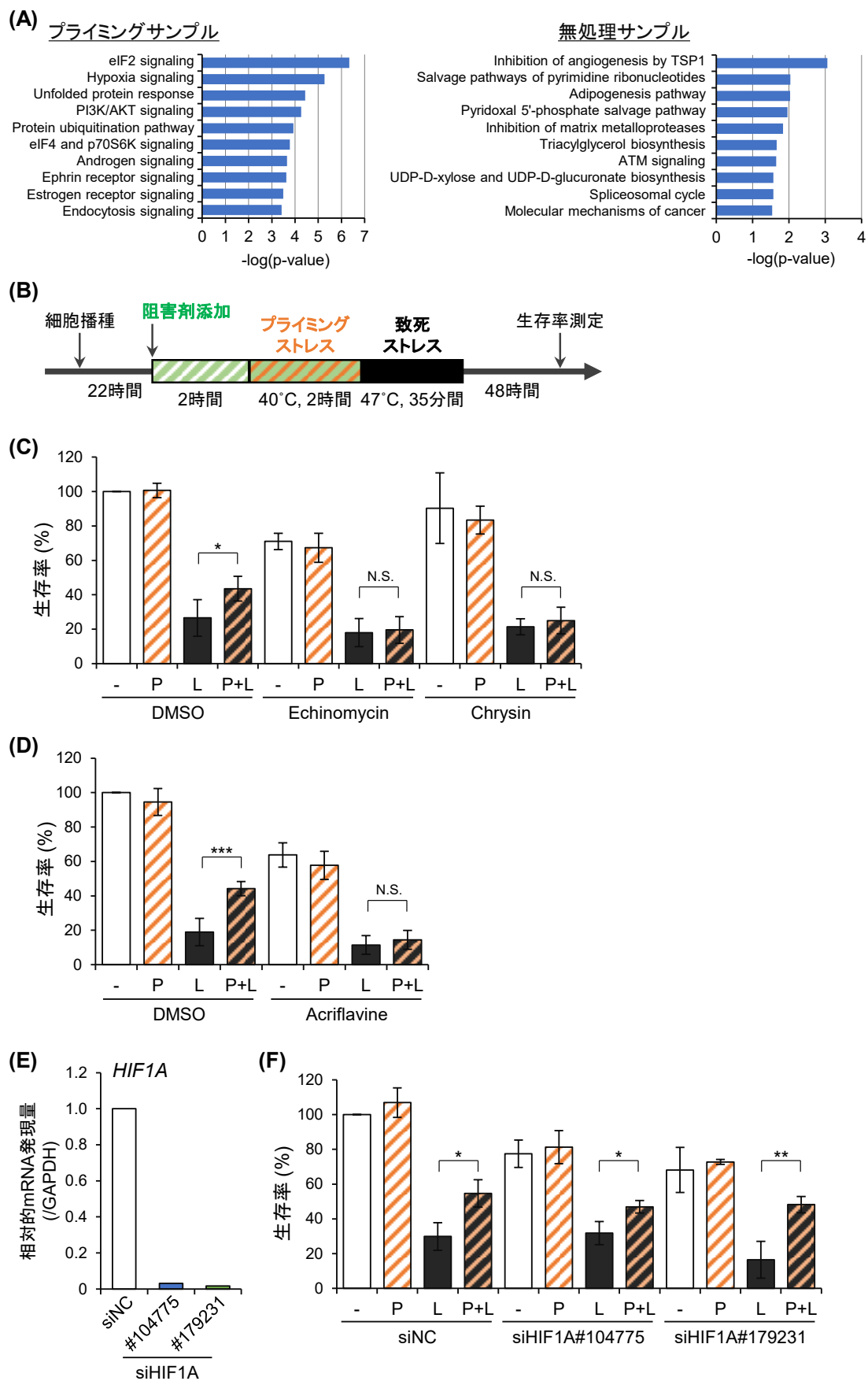


図 3-17 獲得耐性の形成に対する転写因子 HIF-1 α の関与は議論の余地がある

(A) プライミングストレス処理をした細胞及び無処理の細胞の HIRA の ChIP-seq データから、HIRA の結合がみられる遺伝子群を抽出し、パスウェイ解析を行った。各サンプルについて、ヒットしたシグナル経路のうち p 値が小さい上位 10 個を示す。

(B) HIF-1 に対する阻害剤を処理した細胞を用いた獲得耐性の実験系のタイムコースを示す。細胞を播種してから 22 時間後に阻害剤を添加し、その 2 時間に 40°C、2 時間のプライミングストレスを与えた。プライミングストレス処理中の培養培地にも阻害剤を添加した。引き続き 47°C、35 分間の致死ストレスを与え、致死ストレス処理から 48 時間後に Cell Counting Kit-8 を用いた WST 法により細胞の生存率を測定した。

(C, D) 陰性対照である DMSO 並びに HIF-1 阻害剤である Echinomycin、Chrycin (C) 及び Acriflavine (D) を添加した場合の獲得耐性実験の生存率を示す。生存率は、それぞれ DMSO を添加した細胞の無処理サンプルに対する相対値として示す。

(E) siRNA による *HIF1A* のノックダウン効率を示す。WI-38-hTERT 細胞を播種するのと同時に *HIF1A* に対する 2 種類の siRNA (#104775 及び #179231) をそれぞれ添加し、24 時間後に全 RNA を回収した。*HIF1A* の発現量を RT-PCR によって定量し、ハウスキーピング遺伝子である *GAPDH* の発現量で正規化し、siRNA Negative Control (siNC) を導入した陰性対照細胞における発現量に対する相対値として示す。

(F) 陰性対照細胞及び 2 種類の siRNA による *HIF1A* ノックダウン細胞における獲得耐性実験の生存率を示す。生存率は、陰性対照細胞の無処理サンプルに対する相対値として示す。

データは独立した実験から得られた平均値 $\pm$ 標準偏差を示す (C: $n=5$ 、D: $n=4$ 、F: $n=3$)。統計解析は両側独立 t 検定を用いた (*, $p < 0.05$ 、**, $p < 0.01$ 、***, $p < 0.005$ 、N.S.: not significant)。

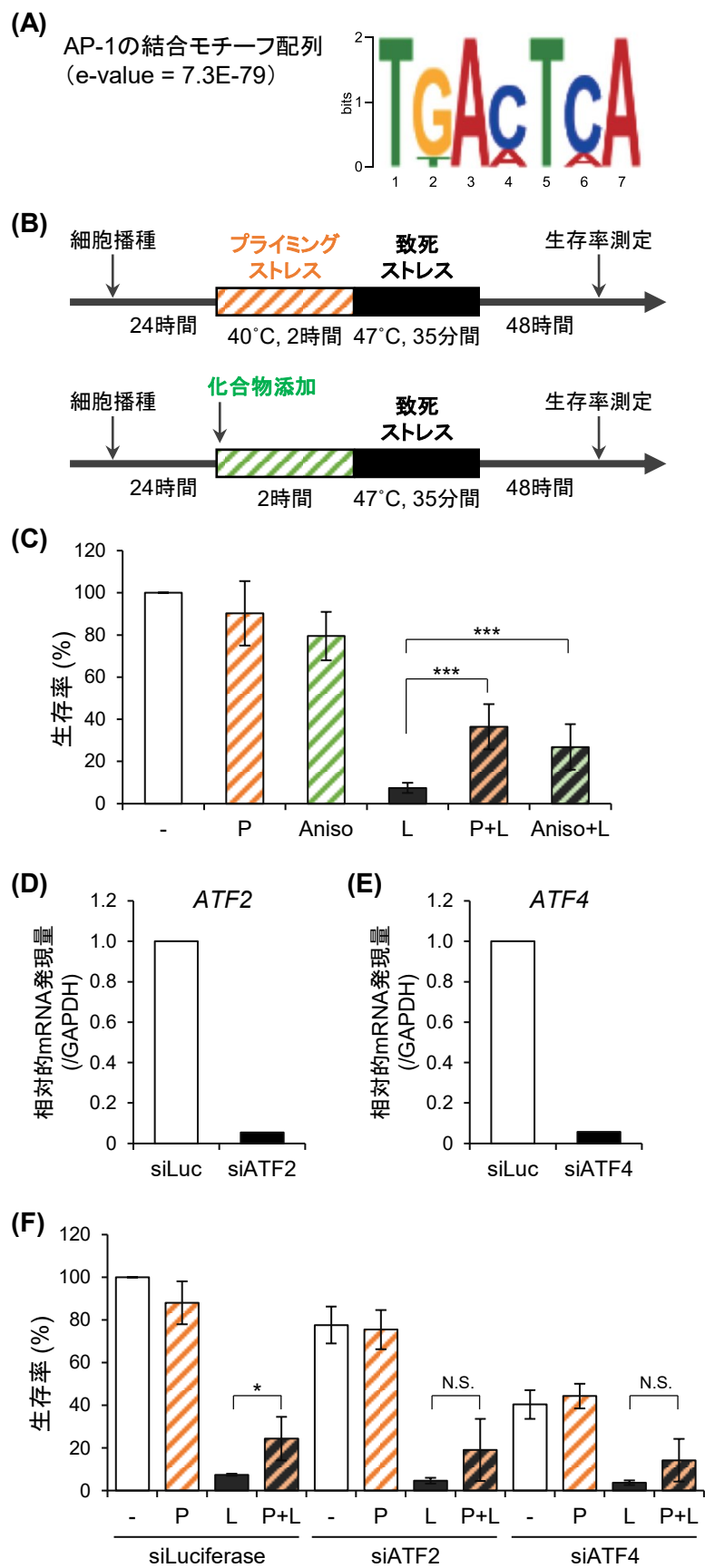


図 3-18 転写因子 AP-1 が獲得耐性の形成に関与している可能性がある

(A) プライミングストレス処理をした細胞における HIRA の ChIP-seq データから HIRA の結合部位に見られるモチーフ解列を解析した結果、転写因子 AP-1 の結合配列が有意に濃縮された。

(B) AP-1 活性化剤である Anisomycin を処理した細胞を用いた獲得耐性の実験系のタイムコースを示す。細胞を播種してから 24 時間後に、通常とおり 40°C、2 時間のプライミングストレス (P) を与えた細胞と、熱ストレスの代わりに AP-1 活性化剤である Anisomycin を 2 時間処理した細胞を準備した。各細胞に引き続き 47°C、35 分間の致死ストレス (L) を与えた。致死ストレス処理から 48 時間後に Cell Counting Kit-8 を用いた WST 法により細胞の生存率を測定した。

(C) Anisomycin を添加した場合の生存率の結果を示す。生存率は、無処理サンプルに対する相対値として示す。

(D, E) siRNA による *ATF2* (D) 並びに *ATF4* (E) のノックダウン効率を示す。WI-38-hTERT 細胞を播種すると同時に *ATF2* 及び *ATF4* に対する siRNA をそれぞれ添加し、24 時間後に全 RNA を回収した。*ATF2* 及び *ATF4* の発現量を RT-PCR によって定量し、ハウスキーピング遺伝子である *GAPDH* の発現量で正規化し、siLuciferase を導入した陰性対照細胞における発現量に対する相対値として示す。

(F) 陰性対照細胞、siRNA による *ATF2* ノックダウン細胞、及び *ATF4* ノックダウン細胞における獲得耐性実験の生存率の結果を示す。生存率は、陰性対照細胞の無処理サンプルに対する相対値として示す。

データは独立した実験から得られた平均値±標準偏差を示す (C: n=5、F: n=3)。統計解析は両側独立 t 検定を用いた (*, $p < 0.05$ 、***, $p < 0.005$ 、N.S.: not significant)

第四章

考察

4-1 低容量ストレス応答における HIRA の機能

本研究では、ヒト細胞の低容量ストレス応答においてヒストンシャペロン HIRA が重要な役割を果たしていることを明らかにした。HIRA はストレス応答性遺伝子の転写を調節し、細胞が致死的なストレスに対する耐性を獲得する過程において中心的な機能を担うことが示された。

ヒト細胞に低容量のプライミングストレスを与えることで、その後の高容量の致死ストレスに対して耐性を示す獲得耐性現象が確認された。しかしながら、HIRA が欠損した細胞ではこの獲得耐性が消失し、HIRA が獲得耐性の形成に不可欠であることが示唆された (図 3-4)。著者が所属した研究室の以前の報告により、分裂酵母において HIRA が獲得耐性に必要であることが示されている (Chujo et al. 2012; Tarumoto et al. 2013)。哺乳類細胞と分裂酵母という異なる生物種間で HIRA を介した獲得耐性現象が保存されていることは注目に値することであり、真核生物が環境に適応して生存するために必須の生体応答であることが示唆される。また、本研究では、熱ストレスをプライミングストレスとして使用したが、HIRA は UV 照射で誘発される DNA 損傷後の転写回復に関与していることが知られていることから (Adam et al. 2013)、UV 照射に対しても HIRA 依存的な獲得耐性応答が観察されるかを調べることは、今後の研究として興味深い。

HIRA の ChIP-seq 解析により、プライミングストレス後に HIRA が特定のストレス応答性遺伝子座にリクルートされることが確認された。特に、HSP70 ファミリーに属する *HSPA1A* 遺伝子及び *HSPA5* 遺伝子での HIRA の局在が顕著に増加することが観察された (図 3-11)。これらの遺伝子は、ストレス応答において重要な役割を果たしており、HIRA がそれらの転写を活性化することで、細胞がストレスに対して迅速かつ効果的に応答できるようにしていると考えられる。興味深いことに、HIRA はプライミングストレス直後のストレス応答性遺伝子の転写には必須ではなかった (図 3-7)。しかし、獲得耐性条件下では、ストレス応答性遺伝子の発現上昇を持続・増強する役割を果たしていることが示された (図 3-8)。この結果は、細胞が低容量ストレスを受けた際にはたらく HIRA によるストレス応答性遺伝子のエピジェネティックな制御が、受けたストレス自体に対応するための反応ではなく、むしろ将来のストレスに備える適応応答として機能していることを示唆している。このような HIRA の役割は、細胞が環境変化に適応するための準備的な応答であると言える。

4-2 獲得耐性の持続性とエピジェネティックメモリー

本研究では、低容量ストレスによる獲得耐性が、HIRA によるヒストン H3.3 のストレス応答性遺伝子への導入によって形成されるエピジェネティックメモリーを介して維持されることが示唆された (図 4-1)。ヒストン H3.3 の導入は、H3K9ac や H3K4me3 などの転写活性化に関連するヒストン翻訳後修飾とともに、ストレス応答性遺伝子の転写

活性化状態を保持する役割を果たしている。この機構により、細胞が再び同様のストレスに曝露された際に迅速に応答することが可能となる。ただし、HIRA を介した転写活性化状態の維持は、細胞の恒常性の観点から、ストレス後に永続するわけではなく、一定期間持続した後は、元の状態に戻ると考えられる。プライミングストレスと致死ストレスの間の時間を変えて獲得耐性の持続時間を測定したところ、2 時間のプライミングストレスはストレス後 2 時間のみ有意な獲得耐性を維持したが (図 3-15B)、24 時間のプライミングストレスでは、6 時間にわたって有意かつ著しく高い耐性が持続することが確認された (図 3-15C)。この結果は、長時間または頻繁な弱いストレスが、長時間持続する強力な適応応答を引き起こすことを示唆しており、細胞が絶えず変動する周囲の環境に適応する機構になっていると考えられる。

また、獲得耐性の持続時間と HIRA によるクロマチン制御の関係について検討するために、プライミングストレス後の時間経過に伴う HIRA 及びエピジェネティックマーカの動態を解析した。その結果、HIRA はプライミングストレス直後にストレス応答性遺伝子の転写開始点にリクルートされ、ヒストン H3.3 並びに H3K9ac や H3K4me3 といったヒストン修飾の増加を引き起こすことが観察された (図 3-14)。しかし、HIRA 及び RNA ポリメラーゼ II の局在は、プライミングストレス後わずか 2 時間以内に基底レベルまで低下した。一方、ヒストン H3.3 及び H3K9ac の量は 8 時間にわたって持続する傾向がみられた。この結果は、エピジェネティックメモリーがクロマチンの活性化状態として保持され、ストレス応答を長期間支える仕組みである可能性を示唆している。過去の報告では、ヒストン H3.3 並びに H3K4me3 や H3K36me3 などの特定のヒストン修飾が遺伝子の活性状態を、世代を超えてエピジェネティックな記憶として保持する例が示されている (Kamada et al. 2018; Kishimoto et al. 2017; Ng and Gurdon 2008)。これらのことから、低容量ストレス応答におけるエピジェネティックメモリーの形成は、細胞が将来のストレスに備えるための長期的な適応戦略である可能性が考えられる。

今回の研究では、長時間のプライミングストレスが耐性持続時間を延長することが示された。この耐性の延長は、HIRA を介したヒストン H3.3 および関連するヒストン修飾の維持時間が長期化することで実現している可能性がある。したがって、長時間のプライミングストレスがヒストン H3.3 や H3K9ac などの修飾をどの程度強化し、どのように長時間維持されるかを詳細に検討することは、エピジェネティックメモリーの理解をさらに深める上で重要な課題となる。一方で、今回の実験で観察された獲得耐性表現型の持続時間は 2 時間であり (図 3-15B)、ヒストン H3.3 及び H3K9ac の増加の保持時間である 8 時間よりも短かった (図 3-14D, E)。獲得耐性の動態と、今回着目したエピジェネティックマーカの動態との間に正確な相関関係は認められなかった。したがって、獲得耐性を維持するためのクロマチン修飾が存在するという仮説が正しい場合、それは他のクロマチン関連因子や追加の条件によって制御されている可能性が考えられる。そのため、他のエピジェネティックマーカークロマチン関連因子の動態についても検証

することは、獲得耐性機構の全貌を明らかにすることにつながるだろう。

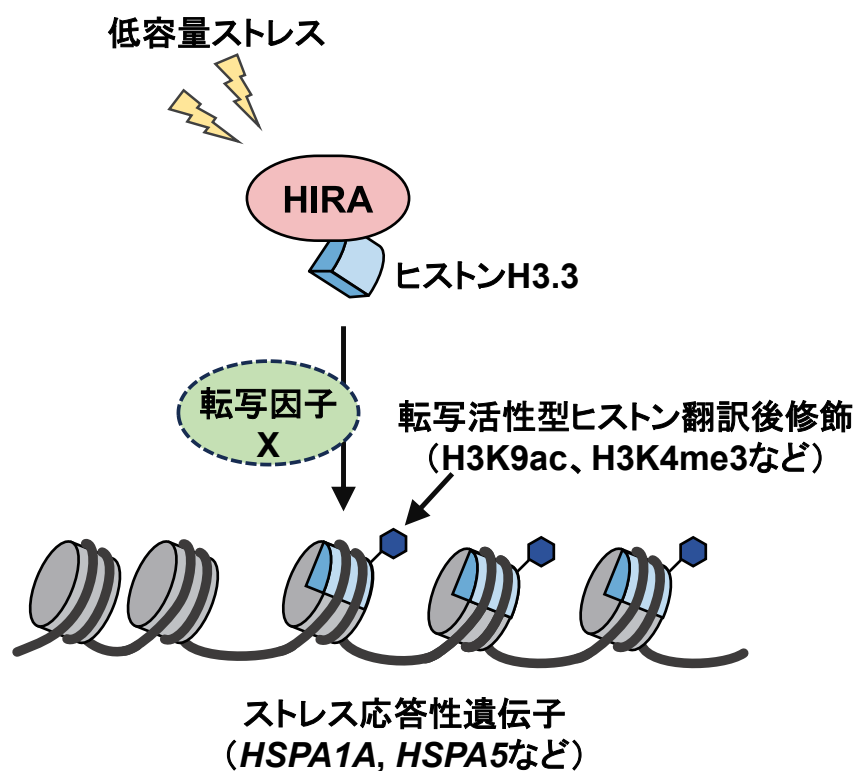


図 4-1 ヒストンシャペロン HIRA を介した獲得耐性形成のモデル

低容量ストレスを受けた細胞において、HIRA がヒストン H3.3 をストレス応答性遺伝子の転写領域に導入し、それに伴い転写活性型のヒストン翻訳後修飾が増加することでエピジェネティックメモリーが形成される。このエピジェネティックメモリーにより、ストレス応答性遺伝子は引き続いてストレスが生じた際に効率的に転写反応が行われ、細胞の生存率を高める。HIRA が特定のストレス応答性遺伝子の領域に動員されるためには、転写因子が協調的に働くと考えられる。

4-3 HIRA の協調因子としての転写因子

低容量ストレス応答において、HIRA がストレス応答性遺伝子の転写を制御するためには、特定の転写因子との協調が必要であることが考えられた。本研究では、HIRA の ChIP-seq 解析結果に基づき、特に AP-1、HSF1 及び HIF-1 に焦点を当て、それぞれが獲得耐性に寄与するかを検討した。

AP-1 はストレス応答性遺伝子の発現を制御する重要な転写因子であり、シーケンスモチーフ解析により、HIRA 結合領域に AP-1 の結合モチーフが有意に存在することが明らかとなった (図 3-18A)。また、AP-1 の構成要素である c-Jun と HIRA との物理的相互作用が報告されており (Pchelintsev et al. 2013)、HIRA は AP-1 によってプロモータ

一領域にリクルートされ、AP-1 の標的遺伝子の転写活性化とエピジェネティック制御を促進する可能性が高い。Anisomycin を用いて AP-1 を活性化させた実験では、プライミングストレス処理と同様に生存率の増加が観察されたことから (図 3-18C)、AP-1 の活性化が HIRA を介した低容量ストレス応答を誘導することが示唆された。また、AP-1 の構成因子である ATF-2 あるいは ATF-4 をノックダウンすると、獲得耐性効果が消失したことから、獲得耐性の形成機構に AP-1 が関与していることが示唆された (図 3-18F)。ただし、ATF-2 及び ATF-4 をノックダウンすると、ストレス無処理条件下でも細胞の生存率がそれぞれ約 80% 及び 40% に低下していた (図 3-18F)。このことから、これら因子は通常条件での細胞の生存においても必要であり、ノックダウン細胞は脆弱な状態にあったため、ストレス応答における作用を特異的に観察することが困難であった可能性がある。低容量ストレス応答における AP-1 の作用をより明確にするには、追加の検証実験が必要である。

HSF1 は、熱ストレスに応答を担う主要な転写因子であり、HSP70 などの熱ショックタンパク質の転写を制御する。HSF1 のノックダウン実験では、プライミングストレスによる獲得耐性効果が部分的に減弱することが確認された (図 3-16)。この結果は、HSF1 が HIRA と協調して熱ショックタンパク質遺伝子の転写を制御し、細胞が将来的なストレスに対して耐性を持つ機構に関与している可能性を示している。HSF1 の獲得耐性への寄与が熱ストレスに特異的なのか、それとも、ストレス種によらず低容量ストレス応答時に普遍的に関与するのかを検討することは、今後の重要な研究課題である。

HIF-1 は、低酸素条件下で活性化される転写因子であり、低酸素応答を制御する。HIF-1 阻害剤を用いた実験では、獲得耐性効果の消失が観察された一方で、siRNA を用いたノックダウン実験では獲得耐性が維持された (図 3-17)。この結果から、HIF-1 が獲得耐性機構に寄与している可能性は否定されないものの、完全には明らかにされなかった。低容量ストレス応答時に HIRA が HIF-1 を介して低酸素応答遺伝子の転写活性を高めるのであれば、熱処理によるプライミングストレスを受けた細胞が、低酸素ストレスに対しても耐性を示すかどうかを検討することは興味深い課題である。

また、HIRA のクロマチンへの結合を助長する因子として、転写因子以外にも例えば、一本鎖 DNA 結合タンパク質複合体である RPA が報告されている (Zhang et al. 2017)。RPA が獲得耐性の形成や維持に関与しているかを検証することも、HIRA を介したストレス応答機構の理解をさらに深めるうえで有意義である。

参考文献

- Adam S, Polo SE, Almouzni G. 2013. Transcription recovery after dna damage requires chromatin priming by the h3.3 histone chaperone hira. *Cell*. 155(1):94-106.
- Ajoolabady A, Lindholm D, Ren J, Pratico D. 2022. Er stress and upr in alzheimer's disease: Mechanisms, pathogenesis, treatments. *Cell Death Dis*. 13(8):706.
- Ali A, Bharadwaj S, O'Carroll R, Ovsenek N. 1998. Hsp90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in xenopus oocytes. *Mol Cell Biol*. 18(9):4949-4960.
- Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS. 2009. Meme suite: Tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res*. 37(Web Server issue):W202-208.
- Banaszynski LA, Wen D, Dewell S, Whitcomb SJ, Lin M, Diaz N, Elsasser SJ, Chapgier A, Goldberg AD, Canaani E et al. 2013. Hira-dependent histone h3.3 deposition facilitates prc2 recruitment at developmental loci in es cells. *Cell*. 155(1):107-120.
- Behjati S, Tarpey PS, Presneau N, Scheipl S, Pillay N, Van Loo P, Wedge DC, Cooke SL, Gundem G, Davies H et al. 2013. Distinct h3f3a and h3f3b driver mutations define chondroblastoma and giant cell tumor of bone. *Nat Genet*. 45(12):1479-1482.
- Bharadwaj S, Ali A, Ovsenek N. 1999. Multiple components of the hsp90 chaperone complex function in regulation of heat shock factor 1 in vivo. *Mol Cell Biol*. 19(12):8033-8041.
- Calabrese V, Cornelius C, Cuzzocrea S, Iavicoli I, Rizzarelli E, Calabrese EJ. 2011. Hormesis, cellular stress response and vitagenes as critical determinants in aging and longevity. *Mol Aspects Med*. 32(4-6):279-304.
- Chujo M, Tarumoto Y, Miyatake K, Nishida E, Ishikawa F. 2012. Hira, a conserved histone chaperone, plays an essential role in low-dose stress response via transcriptional stimulation in fission yeast. *J Biol Chem*. 287(28):23440-23450.
- Cleven AH, Höcker S, Briaire-de Bruijn I, Szuhai K, Cleton-Jansen AM, Bovée JV. 2015. Mutation analysis of h3f3a and h3f3b as a diagnostic tool for giant cell tumor of bone and chondroblastoma. *Am J Surg Pathol*. 39(11):1576-1583.
- Cullinan SB, Gordan JD, Jin J, Harper JW, Diehl JA. 2004. The keap1-btb protein is an adaptor that bridges nrf2 to a cul3-based e3 ligase: Oxidative stress sensing by a cul3-keap1 ligase. *Mol Cell Biol*. 24(19):8477-8486.
- Derisbourg MJ, Hartman MD, Denzel MS. 2021. Perspective: Modulating the integrated stress response to slow aging and ameliorate age-related pathology. *Nat Aging*. 1(9):760-768.
- Dutta D, Ray S, Home P, Saha B, Wang S, Sheibani N, Tawfik O, Cheng N, Paul S. 2010. Regulation of angiogenesis by histone chaperone hira-mediated incorporation of lysine

- 56-acetylated histone h3.3 at chromatin domains of endothelial genes. *J Biol Chem.* 285(53):41567-41577.
- Fontana L, Meyer TE, Klein S, Holloszy JO. 2004. Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(17):6659-6663.
- Furukawa M, Xiong Y. 2005. Btb protein keap1 targets antioxidant transcription factor nrf2 for ubiquitination by the cullin 3-roc1 ligase. *Mol Cell Biol.* 25(1):162-171.
- Goldberg AD, Banaszynski LA, Noh KM, Lewis PW, Elsaesser SJ, Stadler S, Dewell S, Law M, Guo X, Li X et al. 2010. Distinct factors control histone variant h3.3 localization at specific genomic regions. *Cell.* 140(5):678-691.
- Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. 2002. Phosphorylation of nrf2 at ser-40 by protein kinase c regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem.* 277(45):42769-42774.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by nrf2 through binding to the amino-terminal neh2 domain. *Genes Dev.* 13(1):76-86.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T, Yamamoto M. 2003. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells.* 8(4):379-391.
- Jin C, Felsenfeld G. 2007. Nucleosome stability mediated by histone variants h3.3 and h2a.Z. *Genes Dev.* 21(12):1519-1529.
- Jin C, Zang C, Wei G, Cui K, Peng W, Zhao K, Felsenfeld G. 2009. H3.3/h2a.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions. *Nat Genet.* 41(8):941-945.
- Kamada R, Yang W, Zhang Y, Patel MC, Yang Y, Ouda R, Dey A, Wakabayashi Y, Sakaguchi K, Fujita T et al. 2018. Interferon stimulation creates chromatin marks and establishes transcriptional memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 115(39):E9162-e9171.
- Kang KW, Ryu JH, Kim SG. 2000. The essential role of phosphatidylinositol 3-kinase and of p38 mitogen-activated protein kinase activation in the antioxidant response element-mediated rgsta2 induction by decreased glutathione in h4iie hepatoma cells. *Mol Pharmacol.* 58(5):1017-1025.
- Khuong-Quang DA, Buczkowicz P, Rakopoulos P, Liu XY, Fontebasso AM, Bouffet E, Bartels U, Albrecht S, Schwartzentruber J, Letourneau L et al. 2012. K27m mutation in histone h3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol.* 124(3):439-447.

- Kim YR, Oh JE, Kim MS, Kang MR, Park SW, Han JY, Eom HS, Yoo NJ, Lee SH. 2010. Oncogenic nrf2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin. *J Pathol.* 220(4):446-451.
- Kimura H, Hayashi-Takanaka Y, Goto Y, Takizawa N, Nozaki N. 2008. The organization of histone h3 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *Cell Struct Funct.* 33(1):61-73.
- Kirkwood TB, Austad SN. 2000. Why do we age? *Nature.* 408(6809):233-238.
- Kishimoto S, Uno M, Okabe E, Nono M, Nishida E. 2017. Environmental stresses induce transgenerationally inheritable survival advantages via germline-to-soma communication in *caenorhabditis elegans*. *Nat Commun.* 8:14031.
- Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsui M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, Yamamoto M. 2004. Oxidative stress sensor keap1 functions as an adaptor for cul3-based e3 ligase to regulate proteasomal degradation of nrf2. *Mol Cell Biol.* 24(16):7130-7139.
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short dna sequences to the human genome. *Genome Biol.* 10(3):R25.
- Liu CP, Xiong C, Wang M, Yu Z, Yang N, Chen P, Zhang Z, Li G, Xu RM. 2012. Structure of the variant histone h3.3-h4 heterodimer in complex with its chaperone daxx. *Nat Struct Mol Biol.* 19(12):1287-1292.
- Liu M, Dudley SC, Jr. 2014. Targeting the unfolded protein response in heart diseases. *Expert Opin Ther Targets.* 18(7):719-723.
- Maze I, Wenderski W, Noh KM, Bagot RC, Tzavaras N, Purushothaman I, Elsasser SJ, Guo Y, Ionete C, Hurd YL et al. 2015. Critical role of histone turnover in neuronal transcription and plasticity. *Neuron.* 87(1):77-94.
- McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. 1989. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. *Nutrition.* 5(3):155-171; discussion 172.
- McKittrick E, Gafken PR, Ahmad K, Henikoff S. 2004. Histone h3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(6):1525-1530.
- Meyer TE, Kovacs SJ, Ehsani AA, Klein S, Holloszy JO, Fontana L. 2006. Long-term caloric restriction ameliorates the decline in diastolic function in humans. *J Am Coll Cardiol.* 47(2):398-402.
- Minamino T, Komuro I, Kitakaze M. 2010. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circ Res.* 107(9):1071-1082.
- Nakato R, Itoh T, Shirahige K. 2013. Drompa: Easy-to-handle peak calling and visualization software for the computational analysis and validation of chip-seq data. *Genes Cells.*

- 18(7):589-601.
- Ng RK, Gurdon JB. 2008. Epigenetic memory of an active gene state depends on histone h3.3 incorporation into chromatin in the absence of transcription. *Nat Cell Biol.* 10(1):102-109.
- Nie Z, Chen M, Wen X, Gao Y, Huang D, Cao H, Peng Y, Guo N, Ni J, Zhang S. 2021. Endoplasmic reticulum stress and tumor microenvironment in bladder cancer: The missing link. *Front Cell Dev Biol.* 9:683940.
- Nitti M, Marengo B, Furfaro AL, Pronzato MA, Marinari UM, Domenicotti C, Traverso N. 2022. Hormesis and oxidative distress: Pathophysiology of reactive oxygen species and the open question of antioxidant modulation and supplementation. *Antioxidants (Basel).* 11(8).
- Ohta T, Iijima K, Miyamoto M, Nakahara I, Tanaka H, Ohtsuji M, Suzuki T, Kobayashi A, Yokota J, Sakiyama T et al. 2008. Loss of keap1 function activates nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res.* 68(5):1303-1309.
- Padmanabhan B, Tong KI, Ohta T, Nakamura Y, Scharlock M, Ohtsuji M, Kang MI, Kobayashi A, Yokoyama S, Yamamoto M. 2006. Structural basis for defects of keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Mol Cell.* 21(5):689-700.
- Pchelintsev NA, McBryan T, Rai TS, van Tuyn J, Ray-Gallet D, Almouzni G, Adams PD. 2013. Placing the hira histone chaperone complex in the chromatin landscape. *Cell Rep.* 3(4):1012-1019.
- Pelham HR. 1982. A regulatory upstream promoter element in the drosophila hsp 70 heat-shock gene. *Cell.* 30(2):517-528.
- Petibon C, Malik Ghulam M, Catala M, Abou Elela S. 2021. Regulation of ribosomal protein genes: An ordered anarchy. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 12(3):e1632.
- Placek BJ, Huang J, Kent JR, Dorsey J, Rice L, Fraser NW, Berger SL. 2009. The histone variant h3.3 regulates gene expression during lytic infection with herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 83(3):1416-1421.
- Rai TS, Puri A, McBryan T, Hoffman J, Tang Y, Pchelintsev NA, van Tuyn J, Marmorstein R, Schultz DC, Adams PD. 2011. Human cabin1 is a functional member of the human hira/ubn1/asf1a histone h3.3 chaperone complex. *Mol Cell Biol.* 31(19):4107-4118.
- Ray-Gallet D, Quivy JP, Scamps C, Martini EM, Lipinski M, Almouzni G. 2002. Hira is critical for a nucleosome assembly pathway independent of dna synthesis. *Mol Cell.* 9(5):1091-1100.
- Ray-Gallet D, Woolfe A, Vassias I, Pellentz C, Lacoste N, Puri A, Schultz DC, Pchelintsev NA, Adams PD, Jansen LE et al. 2011. Dynamics of histone h3 deposition in vivo reveal a

- nucleosome gap-filling mechanism for h3.3 to maintain chromatin integrity. *Mol Cell*. 44(6):928-941.
- Ricketts MD, Dasgupta N, Fan J, Han J, Gerace M, Tang Y, Black BE, Adams PD, Marmorstein R. 2019. The hira histone chaperone complex subunit ubn1 harbors h3/h4- and dna-binding activity. *J Biol Chem*. 294(23):9239-9259.
- Ricketts MD, Frederick B, Hoff H, Tang Y, Schultz DC, Singh Rai T, Grazia Vizioli M, Adams PD, Marmorstein R. 2015. Ubinuclein-1 confers histone h3.3-specific-binding by the hira histone chaperone complex. *Nat Commun*. 6:7711.
- Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. 2011. Integrative genomics viewer. *Nat biotechnol*. United States. p. 24-26.
- Sarup P, Petersen SM, Nielsen NC, Loeschcke V, Malmendal A. 2016. Mild heat treatments induce long-term changes in metabolites associated with energy metabolism in drosophila melanogaster. *Biogerontology*. 17(5-6):873-882.
- Satyral SH, Chen D, Fox SG, Kramer JM, Morimoto RI. 1998. Negative regulation of the heat shock transcriptional response by hsbp1. *Genes Dev*. 12(13):1962-1974.
- Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu XY, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, Sturm D, Fontebasso AM, Quang DA, Tönjes M et al. 2012. Driver mutations in histone h3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*. 482(7384):226-231.
- Shibata T, Kokubu A, Gotoh M, Ojima H, Ohta T, Yamamoto M, Hirohashi S. 2008. Genetic alteration of keap1 confers constitutive nrf2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer. *Gastroenterology*. 135(4):1358-1368, 1368.e1351-1354.
- Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y. 2004. Histone h3.1 and h3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of dna synthesis. *Cell*. 116(1):51-61.
- Tang Y, Poustovoitov MV, Zhao K, Garfinkel M, Canutescu A, Dunbrack R, Adams PD, Marmorstein R. 2006. Structure of a human asf1a-hira complex and insights into specificity of histone chaperone complex assembly. *Nat Struct Mol Biol*. 13(10):921-929.
- Tarumoto Y, Kanoh J, Ishikawa F. 2013. Receptor for activated c-kinase (rack1) homolog cpc2 facilitates the general amino acid control response through gcn2 kinase in fission yeast. *J Biol Chem*. 288(26):19260-19268.
- Tian X, Zhang S, Zhou L, Seyhan AA, Hernandez Borrero L, Zhang Y, El-Deiry WS. 2021. Targeting the integrated stress response in cancer therapy. *Front Pharmacol*. 12:747837.
- Wu G, Broniscer A, McEachron TA, Lu C, Paugh BS, Becksfort J, Qu C, Ding L, Huether R, Parker M et al. 2012. Somatic histone h3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat Genet*. 44(3):251-253.

- Yang JH, Song Y, Seol JH, Park JY, Yang YJ, Han JW, Youn HD, Cho EJ. 2011. Myogenic transcriptional activation of myod mediated by replication-independent histone deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(1):85-90.
- Yoshihama M, Uechi T, Asakawa S, Kawasaki K, Kato S, Higa S, Maeda N, Minoshima S, Tanaka T, Shimizu N et al. 2002. The human ribosomal protein genes: Sequencing and comparative analysis of 73 genes. *Genome Res*. 12(3):379-390.
- Zhang H, Gan H, Wang Z, Lee JH, Zhou H, Ordog T, Wold MS, Ljungman M, Zhang Z. 2017. Rpa interacts with hira and regulates h3.3 deposition at gene regulatory elements in mammalian cells. *Mol Cell*. 65(2):272-284.
- Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voellmy R. 1998. Repression of heat shock transcription factor hsf1 activation by hsp90 (hsp90 complex) that forms a stress-sensitive complex with hsf1. *Cell*. 94(4):471-480.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、卓越した知識と斬新なアイデア、適切なご助言をもって研究の方向性を示し、長年にわたって研究指導を続けてくださった指導教員の石川冬木教授に深く感謝申し上げます。

次世代シーケンサー解析の共同研究を実施いただいた白髭克彦博士及び中戸隆一郎博士（東京大学）に深く感謝いたします。細胞株とプラスミドベクターをご供与くださり、また、いつも明るく激励くださった米原伸博士（京都大学）に感謝いたします。ヒストンの翻訳後修飾に対する各種抗体を分与いただいた木村宏博士（東京工業大学）に感謝いたします。

著者が所属した研究室において、日頃から研究に関する議論を行っていただき、絶えず親身なご支援とご指導をくださった鍋谷彰博士、樽本雄介博士、定家真人博士、三好知一郎博士及び林眞理博士に心より深く感謝いたします。本研究をともに遂行し、研究内容の議論を続けるとともに、原著論文のリバイス実験とリビジョン原稿の作成に協力いただいた小櫻裕司氏、麓裕希子氏及び Theventhiran Mahandaran 氏に心より感謝いたします。実験操作の基礎から丁寧にご指導いただき、研究のみならず大学院での生活全般について親身に相談に乗ってくださった片山雄一郎氏に心よりお礼申し上げます。試薬作製等の実験補助を実施いただき、本研究を支えてくださった田村美樹氏及び渡邊祐三氏に感謝いたします。研究室の煩雑な事務処理を円滑に行ってくださった秘書の片山亜希子氏、白淵愛依子氏、山崎恵莉子氏、福村姿子氏、津田貴子氏及び平田陽子氏にお礼申し上げます。同時期に研究室に所属し、研究から私生活まで苦楽をともにした石川正真博士及び野間直十氏に感謝いたします。そして、研究室生活のさまざまな場面でお世話になった石川研究室の皆様に厚くお礼申し上げます。

最後に、大学院での研生活に対して経済的援助をしていただき、また優しく見守っていただいた両親と、精神面及び健康面のサポートをいただいた妻に深く感謝いたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Yoshikazu Nagagaki, Yuji Kozakura, Theventhiran Mahandaran, Yukiko Fumoto, Ryuichiro Nakato, Katsuhiko Shirahige, and Fuyuki Ishikawa

Histone H3.3 chaperone HIRA renders stress-responsive genes poised for prospective lethal stresses in acquired tolerance

Genes to Cells. 2024 Sep;29(9):722-734.